

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

SYNTHÈSES DE BRASSINOSTÉROÏDES  
ET ÉTUDE DE LEUR POTENTIEL  
NEUROPROTECTEUR

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR  
MARTIN BOISVERT

DÉCEMBRE 2009

# UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

## Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être mené à terme sans l'aide des personnes suivantes et je tiens personnellement à les remercier.

Je remercie d'abord Benoit Daoust qui a accepté d'être mon directeur de recherche ainsi que le groupe de recherche de Maria-Grazia Martinoli qui a effectué nos tests biologiques. Un grand merci au FQRNT qui m'a octroyé une bourse de recherche, ce fut très apprécié. Merci aussi à Isabelle Rheault (UQAM) qui a réalisée mes analyses SMHR.

Je dois aussi souligner la grande disponibilité et l'immense gentillesse du personnel de soutien et du personnel technique de l'UQTR. En particulier, je remercie Jocelyn Bouchard qui a toujours une solution à nos problèmes de matériel. Merci au professeur Roland Côté, dont je n'oublierai jamais ses connaissances colossales de chimie. Je dois aussi mentionner le docteur Atul Gupta qui m'a donné support et conseils pendant une grande partie de ce projet. Merci aussi au professeur Gervais Bérubé qui m'a transmis sa passion pour la chimie organique.

Ces deux années auraient pu paraître encore plus longues si ce ne fut des personnes suivantes. Je ne saurai remercier assez Rana Hanna. Tu es probablement la grande sœur que je n'ai jamais eu. Merci à Sabine Binder, que faire sans tes conseils remplis de sagesse. Merci à Neel Rahem, tes blagues et tes histoires délirantes inventées étaient peut-être souvent d'un mauvais goût remarquable, mais elles m'ont fait oublier mes soucis.

Finalement, je remercie parents et amis qui m'ont soutenu pendant la réalisation de ce travail et durant ces 2 années.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES SPECTRES.....	xii
LISTE DES TABLEAUX .....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xvi
RÉSUMÉ .....	xx

### PARTIE I : SYNTHÈSES DE BRASSINOSTÉROÏDES ET DE LEURS PRÉCURSEURS

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	2
1.1 La découverte d'une nouvelle classe d'hormones de plantes .....	2
1.2 Caractéristiques structurales des brassinostéroïdes.....	4
1.3 Propriétés et applications des brassinostéroïdes.....	7
1.4. Maladie de Parkinson et stress oxydatif.....	9
1.4.1 Généralités de la maladie de Parkinson.....	9
1.4.2 Hypothèses sur les causes de la mort des neurones dopaminergiques.....	10
1.4.3 Stress oxydatifs et dommages cellulaires .....	11
1.4.4 Liens entre le stress oxydatif et le Parkinson .....	13
1.5 Objectifs du projet de recherche .....	15
1.5.2 Premier objectif .....	15
1.5.2 Second objectif.....	16

CHAPITRE II : STRATÉGIES DE SYNTHÈSE .....	17
2.1 Choix du produit de départ .....	17
2.2 Plan de synthèse.....	21
2.3 Régiosélectivité de la réaction de Baeyer-Villiger chez les précurseurs des brassinostéroïdes .....	23
2.4 La nécessité d'utiliser la dihydroxylation asymétrique dans l'obtention du stéréoisomère désiré.....	27
CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE LA 28-HOMOCASTASTÉRONNE.....	32
3.1 Tosylation et mésylation du stigmastérol <b>32</b> .....	32
3.2 Réarrangement <i>i</i> stérol du mésylate de stigmastérol <b>47</b> .....	33
3.3 Oxydation de l'alcool <b>31</b> en cétone <b>28</b> .....	36
3.4 Addition-Élimination sur <b>28</b> menant au diène <b>27</b> .....	37
3.5 Dihydroxylation asymétrique du diène <b>27</b> .....	40
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE DE PRÉCURSEURS DE BRASSINOSTÉROÏDES.....	47
4.1 Introduction.....	47
4.2 Synthèse du diol <b>53</b> et de l'acétonide <b>54</b> .....	48
4.3 Synthèse du précurseur de la 28-Homotéastérone <b>25</b> .....	52
4.4 Inversion de l'alcool <b>33</b> en l'alcool <b>36</b> .....	60
4.5 Réduction de la cétone <b>33</b> par substitution réductrice d'un mésylate .....	64
4.6 Réduction de l'alcool <b>33</b> par l'utilisation d'une hydrazone .....	73
CHAPITRE V : RÉACTIVITÉ DU LIEN C=C EN C-22, C-23 DES PRÉCURSEURS DES BRASSINOSTÉROÏDES .....	77
5.1 Introduction.....	77
5.2 Réactivité du lien C=C en C-22,C-23 face à la dihydroxylation.....	78
5.3 Hypothèse sur la faible réactivité des précurseurs <b>28</b> , <b>54</b> et <b>55</b> face à la dihydroxylation asymétrique .....	82
5.4 L'époxydation, un moyen de contourner la dihydroxylation asymétrique catalytique .....	89

5.5 L'hydrogénation catalytique permet la réduction du lien C=C en C-22, C-23 ....	94
5.6 Conclusions .....	95

## PARTIE II : ÉVALUATION DU POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DES MOLECULES PRÉPARÉES

CHAPITRE VI : ÉVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DES BRASSINOSTÉROÏDES .....	97
6.1 Introduction.....	97
6.2 Le MPP <sup>+</sup> , un modèle toxicologique de la maladie de Parkinson .....	98
6.3 L'évaluation du potentiel neuroprotecteur des molécules préparées .....	100
6.4 Résultats obtenus pour le potentiel neuroprotecteur des molécules préparées .....	102
6.5 Conclusions.....	106
CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE .....	107

## PARTIE III : MÉTHODOLOGIE

CHAPITRE VIII : PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	110
8.1 Remarques générales .....	110
8.2 Préparation des molécules présentées au chapitre 3 .....	112
8.2.1 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3β-(methylsulfonyloxy)-stigmasta-5,22- diène ( <b>47</b> ) .....	112
8.2.2 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3α,5-cyclo-stigmast-22-en-6β-ol ( <b>31</b> ) .....	113
8.2.3 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3α,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one ( <b>28</b> ) .....	114
8.2.4 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-stigmasta-2,22-dien-6-one ( <b>27</b> ) .....	115
8.2.5 Préparation du (22 <i>R</i> , 23 <i>R</i> , 24 <i>S</i> )-2α,3α,22,23-tetrahydroxy-5α- stigmastan-6-one ( <b>24a</b> ) et son isomère 22( <i>S</i> ), 23( <i>S</i> ) ( <b>24b</b> ) .....	116
8.2.6 Préparation du (24 <i>S</i> )-2α,3α,22,23-tetrahydroxy-5α-stigmastan-6-one 2,3,22,23 diacétonide ( <b>48</b> ) .....	117

8.3 Préparation des molécules présentées au chapitre 4 .....	118
8.3.1 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (53) .....	118
8.3.2 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3- acetonide (54) .....	119
8.3.3 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -acetoxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (55) .....	120
8.3.4 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (33) .....	121
8.3.5 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ -(4-nitrobenzoyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22- én-6-one (60) .....	121
8.3.6 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-én-6-one (36) .....	123
8.3.7 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)- silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (62) .....	124
8.3.8 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)- silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol (63) .....	125
8.3.9 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)- silyloxy)-stigmasta-5,22-diene (65) .....	127
8.3.10 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (34) .....	128
8.4 Préparation des molécules présentées au chapitre 5 .....	129
8.4.1 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-22,23-dihydroxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmastan- 6-one (72) .....	129
8.4.2 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -acétoxy-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ - stigmast-22-ene (77) .....	130
8.4.3 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-én- 3 $\beta$ -ol (78) .....	131
8.4.4 Préparation du (22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1diméthyl-(1,1-diméthylethyl)- silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene (79) .....	132
8.4.5 Préparation du (24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)-silyloxy)-6- (1,3-dioxolan-2-yl)-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastane (80) .....	133

8.4.6 Préparation du (24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>75</b> ).....	134
8.4.7 Préparation du (24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>81</b> ) .....	135
APPENDICE A : SPECTRES RMN $^1\text{H}$ .....	137
APPENDICE B : SPECTRES RMN $^{13}\text{C}$ .....	161
RÉFÉRENCES.....	185



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Brassinolide, le premier brassinostéroïde découvert et caractérisé.....	3
1.2 Ressemblances structurales entre le brassinolide, la testostérone et le cholestérol.....	4
1.3 Quelques brassinostéroïdes typiques.....	5
1.4 Réactions métaboliques simplifiées typiques du stress oxydatif.....	12
1.5 Brassinostéroïdes présents dans les plantes comestibles du Québec.....	16
2.1 Brassinostéroïdes cibles à obtenir .....	17
2.2 Désunion C-O de la fonctionnalité <i>cis</i> diol .....	18
2.3 Insertion nucléophile sur <b>28</b> suivie d'une élimination menant à la formation du diène <b>27</b> .....	19
2.4 Réarrangement <i>i</i> stérol du tosylate <b>30</b> selon Adams et Winsteins.....	20
2.5 Structure du Stigmastérol, le produit de départ de nos synthèses.....	21
2.6 Notre plan de synthèse initial pour l'obtention des molécules cibles .....	22
2.7 Résultat prédit lors de la réaction de Baeyer-Villiger sur <b>24</b> en appliquant la logique de l'aptitude à la migration des groupes alkyles.....	25
2.8 Effet du changement de l'oxydant dans la régiosélectivité de la réaction de Baeyer-Villiger sur <b>40</b> selon Back.....	26
2.9 Sélectivité observée lors de la formation de la 24-épicastastérone par dihydroxylation du diène <b>42</b> avec OsO <sub>4</sub> selon Ikekawa.....	27
2.10 Hypothèse sur la sélectivité en C-2,C-3 lors de la dihydroxylation avec OsO <sub>4</sub> du diène <b>42</b> .....	28
2.11 Sélectivité observée lors de la formation de <b>44a</b> par dihydroxylation du diène <b>27</b> avec OsO <sub>4</sub> selon Mori.....	29

2.13	Dihydroxylation asymétrique de Sharpless réalisé sur <b>45</b> par Watanabe.....	31
3.1	Mésylation et Tosylation du Stigmastérol <b>32</b> .....	32
3.2	Réarrangement <i>i</i> du mésylate <b>47</b> en alcool <b>31</b> .....	34
3.3	Possibilité d'attaque par un nucléophile en C-3 et en C-6 sur le cation allylcarbinyne du stigmastérol .....	34
3.4	Oxydation de l'alcool stéroïdien <b>31</b> en cétone <b>28</b> .....	36
3.5	Addition-élimination sur la cétone <b>28</b> conduisant au diène <b>27</b> .....	38
3.6	Nécessité d'interconvertir <b>27a</b> en son conformère <b>27b</b> afin de réaliser la E <sub>2</sub> .....	39
3.7	Activation du tétroxyde d'osmium pour la dihydroxylation d'alcène en utilisant une amine tertiaire .....	41
3.8	Dihydroxylation asymétrique du diène <b>27</b> menant à la castastérone <b>24a</b> désiré et son isomère non désiré <b>24b</b> .....	41
3.9	Dérivatisation du mélange d'isomères de castastérone <b>24</b> en bis-acétonide <b>48</b> et en tétraacétate <b>49</b> pour tenter leur séparation.....	43
3.10	Attaque régiosélective d'un nucléophile sur l'aldéhyde <b>50</b> contrôlé par le modèle de Felkin-Ahn .....	44
3.11	Insertion régiosélective d'un isobuténolide sur l'aldéhyde <b>52</b> .....	45
3.12	Plan pour la préparation du diol protégé <b>54</b> .....	46
4.1	Synthèses des molécules abordées au chapitre 4.....	48
4.2	Dihydroxylation stéréo et régiosélective du diène <b>27</b> en diol <b>53</b> .....	49
4.3	Section entre 3,6 et 4,2 ppm du RMN <sup>1</sup> H 200 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) de <b>53</b> avant (a) et après (b) recristallisation .....	50
4.4	Dérivatisation du diol <b>53</b> en dérivé OTMS <b>53b</b> .....	50
4.5	Protection du diol <b>53</b> sous forme d'acétonide <b>54</b> .....	51
4.6	Insertion d'un Acétate en position C-3 sur la cétone <b>28</b> .....	53
4.7	Séquence réactionnelle optimisée pour la formation de l'acétate <b>55</b> à partir de la cétone <b>28</b> .....	54
4.8	Proximité spatiale entre H-3 et H-5 chez l'acétate <b>55</b> .....	55
4.9	Spectre RMN <sup>1</sup> H de <b>55</b> à 600 MHz dans CDCl <sub>3</sub> .....	55

4.10	Spectre RMN NOESY de <b>55</b> à 600 MHz dans CDCl <sub>3</sub> .....	56
4.11	Règle de Karplus : effet de l'angle dièdre sur la constante de couplage vicinale dans un système cyclique figé.....	57
4.12	Signal RMN <sup>1</sup> H à 200 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) engendré par chacun des hydrogènes en position C-3 des deux épimères <b>33</b> et <b>36</b> .....	58
4.13	Hydrolyse de l'acétate <b>55</b> en alcool <b>33</b> .....	60
4.14	Formation du p-nitroester <b>60</b> à partir de l'alcool <b>33</b> par la réaction de Mitsunobu.....	62
4.15	Formation du produit secondaire principal lors de la réaction de Mitsunobu.....	63
4.16	Formation de l'épimère <b>36</b> par inversion de Mitsunobu sur <b>33</b> .....	64
4.17	Séquence réactionnelle envisagée pour la préparation de <b>34</b> à partir de <b>34</b> .....	66
4.18	Séquence réactionnelle utilisée pour la réduction de <b>33</b> menant à <b>34</b> .....	67
4.19	Stéréoisomère possible lors de la réduction du carbonyle de <b>62</b> .....	68
4.20	Signaux RMN <sup>1</sup> H à 200 MHz dans CDCl <sub>3</sub> des hydrogènes en C-3 et C-6 de <b>63a</b> .....	69
4.21	Produits possibles formés lors de l'élimination du mésylate <b>64a</b> .....	70
4.22	Préparation de l'éther silylé <b>65</b> à partir du stigmastérol <b>32</b> .....	71
4.23	Comparaison des RMN <sup>1</sup> H à 200 MHz dans CDCl <sub>3</sub> de <b>65</b> (haut) et du produit d'élimination observé lors de la mésylation de <b>63</b> (bas).....	72
4.24	Réduction d'une cétone avec p-TsNHNH <sub>2</sub> .....	74
4.25	Réduction de <b>62</b> conduisant à l'alcool <b>34</b> en utilisant p-TsNHNH <sub>2</sub> .....	75
4.26	Réduction de <b>33</b> conduisant à l'alcool <b>34</b> en utilisant p-TsNHNH <sub>2</sub> .....	75
5.1	Spectre RMN <sup>1</sup> H 200 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit secondaire <b>73</b> isolé lors de la purification de <b>48</b> .....	83
5.2	Spectre RMN <sup>1</sup> H 200 MHz dans CDCl <sub>3</sub> de <b>24</b> , <b>48</b> , <b>53</b> , <b>54</b> et <b>72</b> entre 3,4 et 6,0 ppm .....	84
5.3	Structure hypothétique du produit secondaire <b>73</b> .....	85
5.4	Hydrolyse de l'ester d'osmium <b>73</b> par un mélange d'amines.....	86

5.5	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200MHz dans $\text{CDCl}_3$ du produit d'hydrolyse <b>74</b> entre 3,4 et 6,2 ppm .....	86
5.6	Époxydation de l'alcool <b>33</b> et de l'acétate <b>55</b> .....	90
5.7	Protection du carbonyle en C-6 de l'acétate <b>55</b> en cétal <b>77</b> .....	91
5.8	Hydrolyse de l'acétate <b>77</b> générant l'alcool <b>78</b> qui est ensuite protégé sous forme d'éther silylé <b>79</b> .....	92
5.9	Formation de l'époxyde <b>80</b> à partir de l'alcène <b>79</b> .....	92
5.10	Hydrogénation catalytique de l'alcool <b>33</b> .....	94
6.1	Structures des molécules dont le potentiel neuroprotecteur fut évalué au Tableau 2 .....	103

## LISTE DES SPECTRES

SPECTRES RMN $^1\text{H}$ .....	137
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(methylsulfonyloxy)-stigmasta-5,22-diene ( <b>47</b> ) .....	138
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol ( <b>31</b> ) .....	139
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one ( <b>28</b> ).....	140
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-stigmasta-2,22-dien-6-one ( <b>27</b> ).....	141
(22 <i>R</i> , 23 <i>R</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>24a</b> ) et isomère 22( <i>S</i> ), 23( <i>S</i> ) ( <b>24b</b> ) .....	142
(24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one-2,3,22,23-diacétonide ( <b>48</b> ) .....	143
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>53</b> ) .....	144
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3-acetonide ( <b>54</b> ) .....	145
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -acetoxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>55</b> ) .....	146
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>33</b> ) .....	147
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ -(4-nitrobenzoyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>60</b> ) .....	148
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>36</b> ).....	149
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22- en-6-one ( <b>62</b> ).....	150
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en- 6 $\beta$ -ol ( <b>63</b> ) .....	151
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-stigmasta-5,22- diene ( <b>65</b> ) .....	152
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol ( <b>34</b> ) .....	153
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-22,23-dihydroxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmastan-6-one ( <b>72</b> ) .....	154
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -acétoxy-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene ( <b>77</b> ) .....	155
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol ( <b>78</b> ).....	156

(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene ( <b>79</b> ).....	157
(24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastane ( <b>80</b> ) .....	158
(24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>75</b> ) .....	159
(24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>81</b> ) .....	160
 SPECTRES RMN <sup>13</sup> C.....	161
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(methylsulfonyloxy)-stigmasta-5,22-diene ( <b>47</b> ) .....	162
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol ( <b>31</b> ) .....	163
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one ( <b>28</b> ).....	164
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-stigmasta-2,22-dien-6-one ( <b>27</b> ).....	165
(22 <i>R</i> , 23 <i>R</i> 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>24a</b> ) et isomère 22( <i>S</i> ), 23( <i>S</i> ) ( <b>24b</b> ) .....	166
(24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3,22,23-diacetonide ( <b>48</b> )	167
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>53</b> ) .....	168
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3-acetonide ( <b>54</b> ) .....	169
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -acétoxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>55</b> ) .....	170
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>33</b> ) .....	171
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ -(4-nitrobenzoyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>60</b> ).....	172
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>36</b> ).....	173
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one ( <b>62</b> ) .....	174
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol ( <b>63</b> ).....	175
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-stigmasta-5,22-diene ( <b>65</b> ) .....	176
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol ( <b>34</b> ) .....	177
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-22,23-dihydroxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmastan-6-one ( <b>72</b> ) .....	178
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -acétoxy-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene ( <b>77</b> ) .....	179
(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol ( <b>78</b> ).....	180

(22 <i>E</i> , 24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene ( <b>79</b> ).....	181
(24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastane ( <b>80</b> ) .....	182
(24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>75</b> ).....	183
(24 <i>S</i> )-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>81</b> ).....	184

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
5.1 Évaluation de la réactivité des molécules <b>28</b> , <b>54</b> et <b>55</b> face à différentes méthodes de dihydroxylation. ....	79
6.1 Effet neuroprotecteur des brassinostéroïdes et de leurs précurseurs contre la toxicité du MPP <sup>+</sup> sur les PC12 neuronales. ....	103



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Acétone
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique
AcOH	Acide acétique
AcOAg	Acétate d'argent
AD-Mix	Mélange de dihydroxylation asymétrique de Sharpless
APTS	Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
Bz	Benzène
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CeCl <sub>3</sub>	Chlorure de cérium (III)
CSA	Acide camphorsulfonique
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse et spectromètre de masse
d	Doublet
DEAD	Azocarboxylate de diéthyle
dd	Doublet de doublet
DCM	Dichlorométhane
DHQ	Dihydroquinine-4-chlorobenzoate
DHQD	Dihydroquinidine-4-chlorobenzoate
DMA	N,N-diméthylacétamide

d.s	Diastéréosélection
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Éthanol
g	Gramme
H <sub>2</sub>	Hydrogène moléculaire
Hz	Hertz
I <sub>2</sub>	Iode moléculaire
IR	Infrarouge
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonate de potassium
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Hexacyanoferrate (III) de potassium
KHCO <sub>3</sub>	Hydrogénocarbonate de potassium
KOH	Hydroxide de potassium
L	Litre
LD <sub>50</sub>	Dose létale 50
LDH	Lactate déshydrogénase
L-DOPA	Acide (S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoïque
m	multiplet
MCPBA	Acide 3-chloroperoxybenzoïque
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MPP <sup>+</sup>	1-méthyl-4-phénylpyridinium
% m/v	Pourcentage masse volume

N <sub>2</sub>	Azote gazeux
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaBH <sub>4</sub>	Borohydrure de sodium
NaIO <sub>4</sub>	Périodate de sodium
NMO	N-Oxide de N-méthylmorpholine
n.O.e	Effet nucléaire Overhauser
NOESY	Spéctroscopie basée sur l'effet n.O.e
Nu	Nucléophile
Pd/C	Palladium sur charbon
P(Ph) <sub>3</sub>	Triphénylphosphine
Py	Pyridine
Py-HCl	Chlorhydrate de pyridine
% R	Pourcentage de rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces oxygénées réactives
RSA	Relation structure activité
RuCl <sub>3</sub>	Chlorure de ruthénium (III)
RuO <sub>4</sub>	Tétroxyde de ruthénium
s	Singulet
SEM	Erreur standard sur la moyenne
SMBR	Spectre de masse à basse résolution
SMHR	Spectre de masse à haute résolution
SNpc	Substantia nigra pars compacta
T	Température

TBAF	Fluorure de <i>tert</i> -butylammonium
TBDMSCI	Chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilane
t-BuOH	3-méthylpropan-3-ol
T <sub>éb</sub>	Température d'ébullition
T <sub>fus</sub>	Température de fusion
TMS	Groupe triméthylsilane
Tp	Température pièce
p-TsNHNH <sub>2</sub>	4-méthylhydrazidesulfonylbenzène

## RÉSUMÉ

Les brassinostéroïdes sont des phytostérols découverts relativement récemment. Les études de plusieurs chercheurs ont déjà montré que ces molécules sont de véritables hormones de croissance pour les plantes. Ces stéroïdes possèdent donc un potentiel important en agriculture. Cependant, à notre connaissance, peu d'études sur les brassinostéroïdes n'a été réalisée chez les mammifères. Sachant que plusieurs phytostérols possèdent un potentiel antioxydant, nous avons porté notre attention sur le potentiel neuroprotecteur des brassinostéroïdes. Dans ce travail de recherche, nous avons tenté de déterminer si les brassinostéroïdes sont aptes à contrer le stress oxydatif, un suspect potentiel dans le déclenchement de la maladie de Parkinson. Cependant, ces molécules ne sont pas facilement accessibles dans la nature ou dans le commerce. Peu de brassinostéroïdes sont commerciaux, leur concentration effective dans les plantes est faible et leur extraction à partir de végétaux est laborieuse. C'est ainsi que nous avons opté pour la synthèse de ces molécules. Dans le présent travail, nous présentons la synthèse de la 28-Homocastastérone et de plusieurs précurseurs de brassinostéroïdes. Nous présentons aussi une étude de la réactivité particulière du lien alcénique en position C-22,C-23 de ces molécules. Finalement, nous présentons nos résultats préliminaires sur le potentiel neuroprotecteur des molécules préparées face au MPP<sup>+</sup>, une toxine reproduisant la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson.

Mots clés : brassinostéroïdes, neuroprotection, synthèse asymétrique, maladie de Parkinson, chimie des stéroïdes.

**PARTIE I : SYNTHÈSES DE BRASSINOSTÉROÏDES ET  
DE LEURS PRÉCURSEURS**

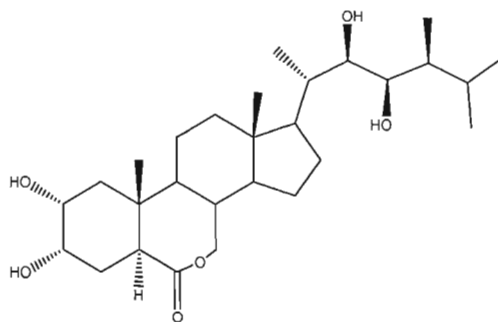
# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 La découverte d'une nouvelle classe d'hormones de plantes

Les brassinostéroïdes sont des phytostéroïls découverts récemment. C'est Mitchell<sup>(1)</sup> qui fut le premier à les étudier. En 1970, il réussit à isoler, grâce à une simple extraction à l'éther, un mélange de composés organiques aux propriétés surprenantes à partir du pollen de *Brassica Napus L.* Lorsque des pousses de soya furent traitées avec ce mélange, il observa que la croissance des plants fut de 8 à 11 fois plus rapide que par rapport aux conditions de culture habituelles. En l'honneur de *Brassica Napus*, il donna le nom de «Brassins» aux mystérieux composants organiques du mélange. De la même façon que les hormones de croissances aident au développement du corps humain, il postula que les brassins permettraient de contribuer à la bonne croissance des plantes. L'étude par RMN  $^1\text{H}$  du mélange lui permit de conclure que les brassins devaient être des molécules contenant des esters d'acides gras et plusieurs motifs typiques aux sucres. Toujours grâce à la RMN  $^1\text{H}$ , il émit l'hypothèse que ces nouvelles hormones végétales ne devaient posséder aucune fonction contenant des protons interchangeable (OH, COOH). Pendant presque dix ans la structure véritable des brassins de Mitchell est demeurée indéterminée. Pendant cette période, plusieurs chimistes tels que Pfeffer<sup>(2)</sup> et Mandava<sup>(3)</sup> ont tenté de synthétiser un nombre impressionnant de molécules ayant les mêmes caractéristiques RMN  $^1\text{H}$  que les brassins de Mitchell. Cependant, les différents sucres et esters d'acides gras synthétiques préparés ne

possédaient guère la capacité d'accélérer la croissance des plants de soya. C'est finalement Grove<sup>(4)</sup> qui réussit à résoudre l'énigme. En 1979, il fut en mesure d'isoler l'élément actif des Brassins après plusieurs extractions et purifications chromatographiques laborieuses. Étant donné que le seul moyen d'identifier formellement la nouvelle hormone de plante était par l'évaluation de son potentiel à accélérer la croissance des plantes, il soumit chacune des différentes fractions isolées aux tests de croissances réalisés par Mitchell. Il réussit ainsi à partir de 227 kg de pollen de *Brassica Napus L* d'obtenir 23 mg de l'hormone de plante tant convoitée. L'analyse par rayons X lui permit de confirmer la structure du phytostérol comme étant celle d'une lactone stéroïdienne polyhydroxylés, soit le 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22(*R*), 23(*R*)-tetrahydroxy-24(*S*)-methyl-B-homo-7-oxa-5- $\alpha$ -cholestan-6-one ou brassinolide (figure 1.1). Mitchell avait donc commis une erreur, la molécule n'était pas un sucre ni un ester d'acide gras insaturé et possédait en plus quatre fonctions hydroxyles. La source de sa faute venait de la faible concentration des brassinostéroïdes dans les extractions réalisées. Grove montra que la concentration en brassinolide dans le pollen de *Brassica Napus L* était d'environ 4 mg de brassinolide / 40 kg de pollen. Le RMN <sup>1</sup>H obtenu par Mitchell était donc plus représentatif des autres constituants de la plante que du brassinolide. C'est ainsi que le premier brassinostéroïde fut découvert et caractérisé, le nouveau terme défini conserve ainsi la tradition nominale des brassins de Mitchell et arbore la nature stéroïdienne de la molécule.



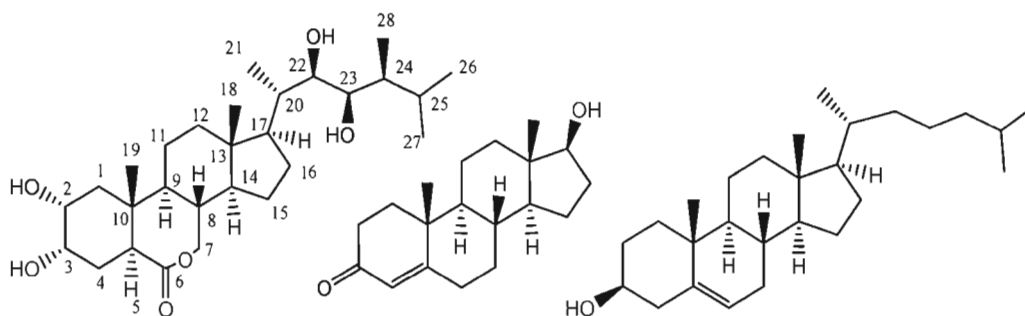
**Figure 1.1** Brassinolide, le premier brassinostéroïde découvert et caractérisé



Comme nous le verrons dans les sections suivantes, le brassinolide n'est qu'un des nombreux brassinostéroïdes présents dans le règne végétale, chacun possédant des caractéristiques structurales et des potentiels hormonaux différents. Depuis 40 ans, les brassinostéroïdes ont été dans la mire de plusieurs chimistes et biologistes. Nous ferons un bref survol des résultats de leurs recherches.

## 1.2 Caractéristiques structurales des brassinostéroïdes

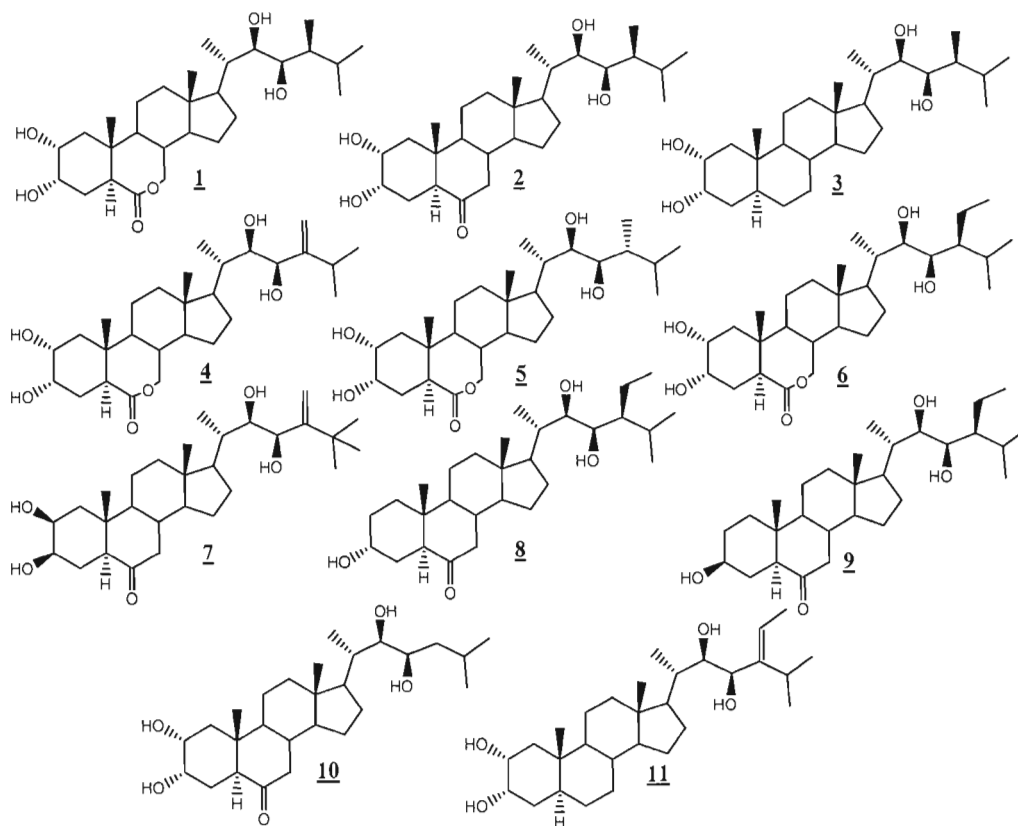
Comme nous venons de le voir, les brassinostéroïdes sont littéralement des stéroïdes de plantes. Nous allons maintenant nous attarder à leurs propriétés structurales leur conférant un caractère unique par rapport aux autres stéroïdes connus. La figure 1.2 permet d'apprécier la ressemblance structurale entre le brassinolide, la testostérone (hormone sexuelle mâle) et le cholestérol (stéroïde présent chez l'humain).



**Figure 1.2** Ressemblances structurales entre le brassinolide, la testostérone et le cholestérol

Nous remarquons tout d'abord que le brassinolide possède bel et bien le squelette à 4 cycles propre aux stéroïdes ainsi que des jonctions entre les cycles en tous points identiques. Cependant une particularité structurale importante le différencie des stéroïdes classiques. En effet, le cycle B du squelette est une lactone à 7 membres ce qui est relativement rare chez les stéroïdes courants<sup>(5)</sup>. Notons aussi la présence

d'une chaîne alkyle en C-17. Contrairement à la lactone du cycle B, cette chaîne alkyle est présente chez plusieurs stéroïdes naturels (par exemple le cholestérol). Elle possède néanmoins un caractère unique chez les brassinostéroïdes. Tous les brassinostéroïdes possèdent la fonctionnalité *cis* diol sur les carbones 22 et 23 de cette chaîne alkyle. De plus, les isomères naturels ont toujours une configuration 22 (*R*), 23(*R*) tel que démontré par Kim<sup>(6)</sup> dans son article sur les propriétés structurales des brassinostéroïdes. Bien évidemment, toutes ces constatations sont générales et s'appliqueront à la majorité des brassinostéroïdes. Certains posséderont toutefois quelques différences caractéristiques. À ce jour, selon Bajguz<sup>(7)</sup>, 70 brassinostéroïdes ont été isolés et caractérisés. Même si chacun des membres de cette grande famille sont uniques, il est toutefois possible d'obtenir un aperçu global de leurs différences structurales en examinant quelques exemples (figure 1.3).



**Figure 1.3** Quelques brassinostéroïdes typiques

Comme plusieurs autres stéroïdes les brassinostéroïdes sont classés en C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> C<sub>29</sub> selon le nombre de carbones qu'ils possèdent, les différences en carbones se manifestant au niveau de la chaîne alkyle. Ainsi **10** est un exemple de brassinostéroïde en C<sub>27</sub> alors que **1**, **2**, **3**, **4** et **5** sont des exemples en C<sub>28</sub> tandis que **6**, **7**, **8**, **9** et **11** sont des exemples en C<sub>29</sub>. Les variations sur la chaîne alkyle se faisant ressentir soit en C-24 (aucun groupement ou la présence d'Et, CH=CH<sub>2</sub> ou Me), soit en C-25 (t-Bu à la place de i-Pr). On remarquera aussi la présence d'espèces ne contenant pas de lactone à 7 atomes dans leur cycle B, mais plutôt une cétone à 6 membres (**2**, **7**, **8**, **9** et **10**). Yokota<sup>(6)</sup> démontra que ces espèces particulières sont en réalité les précurseurs des lactones à 7 membres. Il prouva entre autre que la biosynthèse de telles molécules passe par une oxydation de type Baeyer-Villiger (nous verrons spécifiquement comment au chapitre 2) de façon à réaliser l'expansion de cycle. Même si ces cétones peuvent être considérées comme des «précurseurs» de brassinostéroïdes, il est généralement admis<sup>(6,8)</sup> qu'elles font tout de même partie de la famille des brassinostéroïdes, car d'une part elles possèdent la capacité à accélérer la croissance des plantes et d'autre part peuvent être extrait des plantes de la même manière que les brassinostéroïdes «classiques». Un raisonnement identique s'applique aux dérivés 6-deoxy ne possédant pas de groupement carbonyle en C-6 (**3** et **11**). N'oublions pas non plus de préciser que la plupart des espèces auront en général un groupement alkyle en C-24 avec la configuration (*S*) et que ceux dont la configuration est (*R*) est relativement rare (tel que **5**). Ajoutons finalement qu'ils existent plusieurs possibilités pour la configuration des OH en C-2 et C-3, ils peuvent être cis 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **10** et **11**) être en 3 $\alpha$  (**8**), 3 $\beta$  (**9**) ou très rarement cis 2 $\beta$ ,3 $\beta$  (**7**). Ceci conclut notre bref survol des différences structurales chez les brassinostéroïdes les plus courants. Même si l'étude de ces différences a pu paraître laborieuse, nous verrons à la section suivante que les propriétés physiologiques des brassinostéroïdes chez les plantes dépendent largement de ces légères différences structurales.

### 1.3 Propriétés et applications des brassinostéroïdes

Les travaux de Mitchell (section 1.1) ont démontrés que les brassinostéroïdes pourraient être fort utiles en agriculture étant donné leur rôle d'hormones de croissance. C'est d'ailleurs pourquoi le département de l'agriculture américaine a consacré une immense quantité de ressources à leur application à la croissance de végétaux comestibles durant les années 70-80<sup>(9)</sup>. L'étude avait surtout comme objectif de déterminer si des plants traités avec les brassinostéroïdes permettraient d'obtenir d'une part des meilleurs rendements en végétaux et d'autre part si le poids moyen des fruits serait augmenté. Ainsi, des graines de laitues, de poivrons, de tomates, de maïs, de radis et de fèves furent traitées avec une solution aqueuse de 0,01 ppm de brassinostéroïdes tout au long de leur croissance. Les résultats obtenus furent plus ou moins satisfaisants. Même si globalement une augmentation de 6-9% du poids moyen et une augmentation de 10-20% en rendement de végétaux furent observées, une fois les lois de statistiques appliquées les résultats obtenus n'étaient pas statistiquement valables. Cependant l'étude n'était guère exhaustive. Seulement deux brassinostéroïdes avaient été étudiés. C'est à dire le brassinolide de Mitchell et Grove ainsi que le premier brassinostéroïde synthétique soit le 22(S), 23(S)-homobrasinolide de Thompson<sup>(10)</sup>. Les américains ont ainsi clos la première page de l'histoire de l'utilisation des brassinostéroïdes en agriculture. Ce ne fût pas du tout le même cas en Asie.

Plusieurs chercheurs chinois et japonais dont Takematsu<sup>(11)</sup> ont plutôt axé leurs recherches sur d'autres brassinostéroïdes notamment le 24-épibrassinolide. Les résultats obtenus par ces biologistes et chimistes étaient cette fois statistiquement valables. Il a été démontré que le traitement de plusieurs végétaux tels que le blé, la pastèque et le maïs avec le 24-épibrassinolide fournissaient des résultats «spectaculaires». Une amélioration de 20% du rendement fut observée pour le maïs, une augmentation de 13% en rendement ainsi qu'une augmentation à la résistance aux maladies fut démontrée pour le blé puis une hausse de 20 % de production fut obtenue pour la pastèque. Ikekawa<sup>(12)</sup> résume très bien les propriétés étonnantes

des brassinostéroïdes découvertes par les chercheurs asiatiques. Globalement, 4 grandes conclusions peuvent être tirées de leur publication :

1. Les brassinostéroïdes sont actifs à des concentrations très faibles, de l'ordre de 0,001 à 0,1 ppm en solution, ce qui représente des concentrations requises 100 fois plus faibles que pour la plupart des autres régulateurs de croissance chez les plantes
2. Les brassinostéroïdes stimulent la croissance des racines des plantes
3. Les brassinostéroïdes ne causent en aucun cas des déformations chez la plante
4. L'effet des brassinostéroïdes chez les plantes est d'autant plus marqué lorsque les plantes se retrouvent en conditions désavantageuses (i.e. température non optimales, forte salinité du sol). Les brassinostéroïdes peuvent donc être considérés comme des «hormones de stress».

Leur effet sur les plantes a tellement été bien documenté que certains modèles RSA ont été mis au point par Kim<sup>(6,12)</sup> afin de relier l'activité de chacune des espèces avec leurs fonctionnalités présentes. Ainsi, les brassinostéroïdes 7-oxa lactoniques seront plus actifs chez les plantes que leur homologue 6-céto. De la même façon, les espèces ne possédant pas d'alcool en position C-2 n'auront en général aucun effet bénéfique chez les plantes. Finalement, la stéréochimie des quatre fonctions hydroxyles est elle aussi très importante. En général, seules les espèces naturelles avec la fonction 22(*R*), 23(*R*) cis diol seront actives, leurs analogues 22(*S*), 23(*S*) synthétiques étant la plupart du temps inefficaces dans l'activation de la croissance des plantes. On notera aussi que les espèces possédant des OH avec la configuration 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$  ont généralement démontré de meilleurs résultats que les espèces 2 $\beta$ ,3 $\beta$ .

En bref, durant les dernières décennies les chercheurs ont réussi à démontrer le caractère hormonal surprenant des brassinostéroïdes en plus d'avoir mis au point avec précision plusieurs modèles afin de prédire leur bioréactivité chez les plantes. Plus récemment plusieurs études ont été réalisées sur divers autres propriétés des brassinostéroïdes chez la plante, notamment leur capacité à stimuler la photosynthèse<sup>(13,14)</sup>. Cependant très peu d'études ont été réalisées sur leur effet potentiel chez les mammifères<sup>(15)</sup>. Une seule de leur propriété fut étudié jusqu'à maintenant avec précision, soit leur non toxicité. En effet les chercheurs de la compagnie japonaise Nippon Kayaku<sup>(12)</sup> ont démontré que la LD<sub>50</sub> du 24-épibrassinolide chez la souris est de plus de 1,000 mg/kg ce qui est très faible. De plus les tests effectués par ces chercheurs montrent également que les brassinostéroïdes ne provoquent pas de mutations chez la souris et le rat. Ceci ouvre donc la porte à la réalisation de différentes études sur ces composés forts intéressants chez les mammifères.

Dans ce projet de recherche nous voulions évaluer l'effet neuroprotecteur des brassinostéroïdes appliquée à la maladie de Parkinson. Pour comprendre la raison qui nous a poussé à croire que ces molécules pouvaient posséder une telle capacité, nous devons maintenant aborder le sujet complexe qu'est la maladie de Parkinson ainsi qu'une de ses causes présumées soit le stress oxydatif.

## 1.4. Maladie de Parkinson et stress oxydatif

### 1.4.1 Généralités de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une neuropathologie affectant 25 000 québécois et plus de 130 000 canadiens<sup>(16)</sup>. Elle se caractérise par plusieurs symptômes typiques<sup>(16,17)</sup> tels que la présence de tremblements involontaires au repos, une lenteur dans l'exécution de certains mouvements, l'apparition d'une certaine rigidité musculaire et l'incapacité du corps humain à maintenir une posture stable. Il a été démontré<sup>(18)</sup> que les symptômes observés sont le résultat de la perte de neurones dopaminergiques

chez le patient. Plus précisément, c'est la mort des neurones dopaminergiques du substantia nigra pars compacta (SNpc) qui mène à l'apparition de ces effets néfastes. La raison principal qui relie la mort de ces neurones et le développement des symptômes se trouve dans le neurotransmetteur que fabriquent ces neurones. Comme leur nom l'indique, ces neurones fabriquent la dopamine (un neurotransmetteur). Cette dopamine a plusieurs rôles à jouer dans l'organisme notamment dans l'exécution de mouvement de manière volontaire et dans le bon fonctionnement des fonctions cognitives du cerveau<sup>(18)</sup>. Lorsque les neurones dopaminergiques sont endommagés, il y a moins de dopamine sécrétée au cerveau et les symptômes apparaissent. Lorsque 80%<sup>(17)</sup> des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée sont rendues non fonctionnelles, les problèmes commencent à apparaître. L'aspect le plus redoutable de la maladie est le fait qu'elle soit incurable, l'organisme étant dans l'incapacité de régénérer les neurones perdus. Il est toutefois possible d'améliorer la qualité de vie des victimes en leur fournissant des doses quotidiennes de L-DOPA, un précurseur de la dopamine, qui une fois métabolisé en dopamine dans l'organisme pourra venir combler la carence causée par la perte des neurones de la voie nigrostriée. L'utilisation directe de dopamine est inutile car celle-ci ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique et se retrouve donc dans l'incapacité de se rendre au cerveau. Notons aussi que les bienfaits apportés par la L-DOPA ne sont que temporaires<sup>(17)</sup>. Après plusieurs années de traitement à la L-DOPA, la plupart des patients développeront certains mouvements involontaires qui seront très difficiles à contrôler. Nous venons ainsi de comprendre indirectement pourquoi la recherche de moyens permettant de prévenir la neurodégénérescence associée au Parkinson est d'une importance capitale. Afin de prévenir cette mort cellulaire, il faut cependant comprendre comment elle se produit.

#### 1.4.2 Hypothèses sur les causes de la mort des neurones dopaminergiques

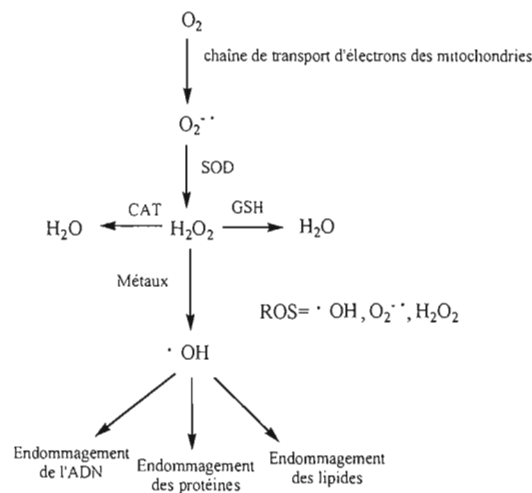
L'étude des processus biologiques jouant un rôle dans la mort des neurones dopaminergiques a intéressé plusieurs chercheurs. Même si aucun phénomène n'a encore été formellement lié à ce processus de neurodégénérescence, il existe

cependant plusieurs hypothèses. Dauer et Przedborski<sup>(17)</sup> résument très bien les 3 grands facteurs qui pourraient être responsables de la perte des neurones dopaminergiques. Ainsi, la mortalité neuronale pourrait être causée par soit une défaillance de la respiration cellulaire au niveau des mitochondries, soit par des dommages cellulaires importants causés par le stress oxydatif ou soit par l'agrégation anormale de protéines au niveau du cytoplasme des neurones. Notons aussi que toujours selon Dauer et Przedborski<sup>(17)</sup>, les 3 phénomènes sont toujours observés chez les sujets atteints de Parkinson. La grande question toujours non élucidée est à savoir lequel (ou lesquels s'il y a lieu) déclenche l'apparition des autres processus de mortalité cellulaire. Bien qu'il existe plusieurs résultats expérimentaux prouvant que chacune des 3 hypothèses pourrait s'avérer exacte, nous n'examinerons que le cas du stress oxydatif car c'est ce phénomène sur lesquelles nos hypothèses de recherches se sont basées.

#### 1.4.3 Stress oxydatifs et dommages cellulaires

L'idée générale de la théorie accusant le stress oxydatif est basée sur la production de radicaux libres au sein des neurones dopaminergiques. Sayre<sup>(19,20)</sup> définit le stress oxydatif comme étant un déséquilibre dans les processus biochimiques de la cellule menant à une accumulation d'espèces oxygénées réactives (ROS). La figure 1.4 telle que présentée par Sayre<sup>(19)</sup> permet de mieux comprendre l'origine et les différents facteurs menant à la formation de ROS.





**Figure 1.4** Réactions métaboliques simplifiées typiques du stress oxydatif

Toute la cascade d'évènements a pour origine les mitochondries. Près de 100% de l'oxygène que nous respirons y est consommé dans les processus de respirations cellulaires afin de maintenir la survie de l'organisme. Cependant, il y a aussi formation de ROS comme produits secondaires. Ces ROS, qui seront généralement des radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ) ou des peroxynitrites ( $\text{O}=\text{NO}_2^-$ ), pourront ainsi venir réagir avec les divers constituants cellulaires que sont les protéines, les acides nucléiques et les lipides et ce sans discrimination. Ces réactions mènent à des dénaturations étant généralement suffisantes pour engendrer la mortalité cellulaire. Il est toutefois à noter qu'en temps normal la cellule possède différents enzymes permettant de réduire les agresseurs oxydants : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GSH) (figure 1.4). Par exemple, le peroxyde d'hydrogène (formé par la réduction enzymatique du radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) avec la SOD) peut être réduit par la catalase en eau ce qui empêche ce peroxyde de se faire cliver par certains métaux (Fe, Zn) en radicaux hydroxyles. Cependant la défaillance dans ces moyens de détoxification entraînera l'accumulation des ROS et mènera les cellules à leur perte. On suspecte<sup>(20)</sup> présentement le stress

oxydatif d'être la cause de plusieurs pathologies tels que l'Alzheimer, le Parkinson et certains problèmes cardiaques.

#### 1.4.4 Liens entre le stress oxydatif et le Parkinson

Plusieurs études ont porté sur les liens entre ce stress oxydatif et la neurodégénérescence du Parkinson. Ainsi, Zhang et al<sup>(21)</sup> et Halliwell et al<sup>(22)</sup> ont démontré respectivement que l'analyse post mortem de fragments d'ADN et de protéines du SNpc d'un cerveau atteint de Parkinson affichait clairement des dommages oxydatifs. Plus particulièrement, Cohen<sup>(23)</sup> postula que les ROS formés pourraient même réagir directement avec les éléments de la chaîne de transport d'électrons produisant d'une part encore plus de radicaux libre et d'autre part causant des dommages aux mitochondries (d'où la défaillance de respiration cellulaire mentionnée en 1.4.2). De plus, toujours selon Cohen, les dommages oxydatifs causés aux protéines pourraient aussi provoquer leur mauvais enroulement et éventuellement mener à la formation d'agrégats dans le cytoplasme de la neurone (section 1.4.2). Les neurones dopaminergiques seraient d'ailleurs un milieu idéal pour la production de ROS selon Graham<sup>(24)</sup>. En effet le métabolisme de la dopamine mènerait à la formation de peroxyde d'hydrogène et de radicaux superoxydes tous deux étant considérés comme des ROS. Ils pourraient bien évidemment causer les dommages cellulaires comme nous l'avons vu ci-haut, mais ils possèdent aussi un tout autre potentiel. Graham montra que ces deux ROS peuvent provoquer l'oxydation de la dopamine, la transformant ainsi en sa forme quinone. Il a d'ailleurs prouvé que cette forme oxydée de la dopamine est cytotoxique, elle peut entre autre venir réagir avec les constituants cellulaires et entraîner des dommages aux neurones dopaminergiques. Les modèles toxicologiques viennent aussi renforcer le lien entre le stress oxydatif et la mort des neurones dopaminergique. Certaines toxines, comme le MPP<sup>+</sup>, permettent d'induire une mortalité cellulaire par stress oxydatif spécifiquement chez les neurones dopaminergiques (nous expliquerons en détails son fonctionnement au chapitre 6). Il a été démontré que tant les dommages que la séquence complète d'évènements

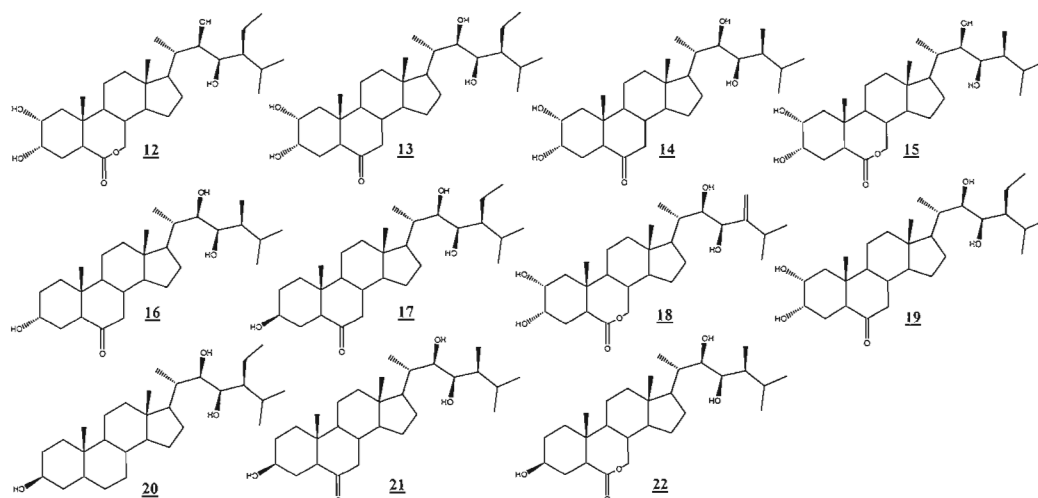
biologiques causés par la toxine concordent en grande majorité avec les symptômes de la maladie de Parkinson <sup>(17)</sup>.

En bref, le stress oxydatif mène à la production de plusieurs ROS qui viennent réagir avec les différents constituants cellulaires des neurones dopaminergiques menant éventuellement à leur perte. De plus, nous avons vu que les neurones dopaminergiques sont des milieux propices à la formation de ROS à cause des produits secondaires issues du métabolisme de la dopamine. La mort de ces neurones provoque une carence en dopamine provoquant l'apparition des divers symptômes classiques du Parkinson. À la lumière de ces informations, il est donc logique de penser que si on réussissait à diminuer l'incidence du stress oxydatif on pourrait peut-être prévenir le développement du Parkinson. L'utilisation d'espèces antioxydantes semble être une voie intéressante pour combattre le stress oxydatif étant donné que ce sont des espèces fortement oxydantes qui le compose. Certains chercheurs<sup>(25,26)</sup> ont même déjà démontré que certains estrogènes (hormones stéroïdiennes femelles) agissent en tant que neuroprotecteur dans des conditions de stress oxydatif. De plus, il est aussi connu<sup>(27)</sup> que plusieurs stéroïdes de plantes sont efficaces pour neutraliser les radicaux libres. C'est l'ensemble de ces indices qui nous a poussé à concentrer nos efforts sur les brassinostéroïdes. Ils ont en plus un avantage de taille, ils se retrouvent dans plusieurs plantes du Québec et, comme nous le verrons à la section suivante, se retrouve entre autre dans plusieurs plantes comestibles. À long terme, sur plusieurs années, il serait donc intéressant de vérifier si une consommation riche en brassinostéroïdes pourrait prévenir l'apparition du Parkinson. À notre connaissance nous sommes les premiers à étudier cette propriété chez les brassinostéroïdes. Maintenant que nos hypothèses et leurs racines ont été bien définies, nous sommes maintenant prêts à formuler clairement les objectifs de notre projet de recherche.

## 1.5 Objectifs du projet de recherche

### 1.5.2 Premier objectif

À la section 1.1 nous avons constaté que certains brassinostéroïdes se retrouvent dans le pollen de certaines plantes. Cependant, ils peuvent aussi se retrouver dans plusieurs autres parties de la plante comme les feuilles et peuvent même se retrouver directement dans les tissus végétaux de la plante. Les travaux de Khripach<sup>(28)</sup> et Bajguz<sup>(29)</sup> nous ont permis d'identifier spécifiquement les légumes et céréales cultivées au Québec contenant des brassinostéroïdes. Les 11 brassinostéroïdes suivants (figure 1.5, p.16) se retrouvent notamment chez la betterave, la carotte, le chou de chine, la courge musquée, le haricot commun, le maïs, le navet, le pois vert, le radis, le sarrasin, le seigle et le tournesol. Un problème de taille se présente toutefois lorsque l'on veut obtenir ces molécules. Tout d'abord aucune de ces 11 molécules n'est disponible commercialement. De plus, comme les expérimentations de Mitchell et Grove l'ont démontré (section 1.1), la concentration effective des brassinostéroïdes dans les plantes est faible. Plus précisément les valeurs se situent généralement entre 0,0001 µg à 6700 µg de brassinostéroïdes par kg de plante selon Bajguz<sup>(29)</sup>. Notons aussi que les procédures d'extraction et de purifications connues<sup>(30)</sup> à partir d'extraits de plantes sont relativement longues et laborieuses. Selon nous, le meilleur moyen d'obtenir ces molécules est donc de réaliser leurs synthèses. La synthèse comporte aussi un atout important soit la possibilité de tester l'activité de neuroprotection au fur et à mesure que les fonctions seront ajoutées. Ainsi il sera possible de cibler laquelle des fonctions contribue à l'activité biologique recherchée. Comme nous le verrons au chapitre 2, plusieurs chimistes ont déjà travaillé à la synthèse de ces produits naturels complexes ce qui nous fournira une aide précieuse dans la préparation de ces hormones de plante particulières.



**Figure 1.5** Brassinostéroïdes présents dans les plantes comestibles du Québec

Étant donné que le projet de recherche global du laboratoire a débuté avec ce présent travail, et faute de temps seulement le 28-homobrassinolide (**12**), le 28-homocastastérone (**13**), le 28-homotéastérone (**17**) et le 6-déoxohomotéastérone (**20**) seront les molécules cibles à préparer. La raison motivant notre choix sur la synthèse de ces molécules en particulier provient du fait qu'elles possèdent tous la même chaîne alkyle en C-17 ce qui facilitera nos synthèses.

### 1.5.2 Second objectif

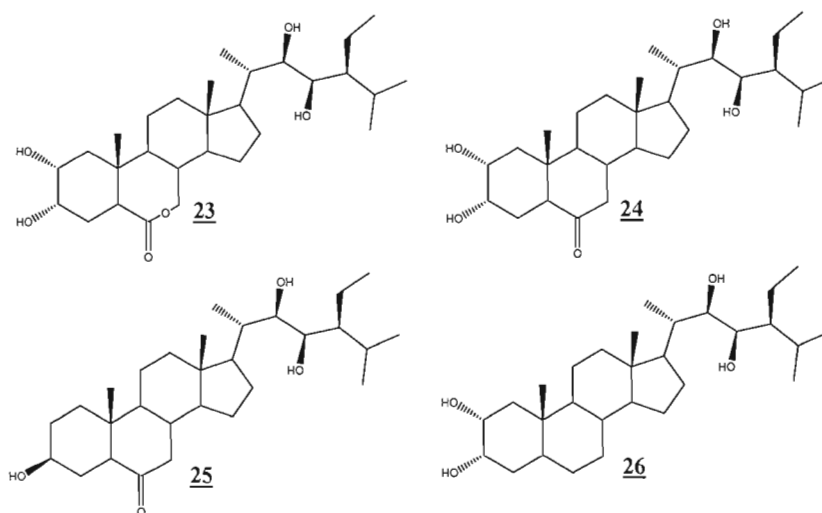
Le potentiel neuroprotecteur des brassinostéroïdes et de leurs précurseurs préparés sera évalué *in vitro* avec un modèle toxicologique de la maladie de Parkinson. Nous pourrons ainsi vérifier le potentiel de nos molécules à combattre le stress oxydatif engendré par une toxine reproduisant le plus possible la neurodégénérescence caractéristique du Parkinson (Chapitre 6).

## CHAPITRE II

### STRATÉGIES DE SYNTHÈSE

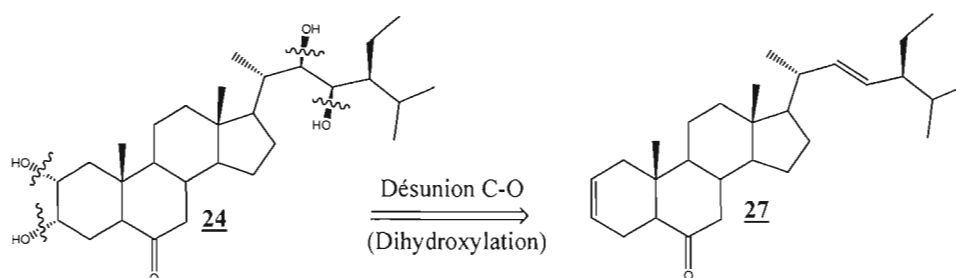
#### 2.1 Choix du produit de départ

Comme nous l'avons vu à la section 1.5.1, quatre brassinostéroïdes constitueront les molécules cibles à obtenir. La figure suivante (figure 2.1) permet de comprendre rapidement la raison pour laquelle nous avons envisagé la synthèse de ces quatre molécules pour démarrer le projet (notons que les quatre ont été renumérotées afin de faciliter la discussion).



**Figure 2.1** Brassinostéroïdes cibles à obtenir

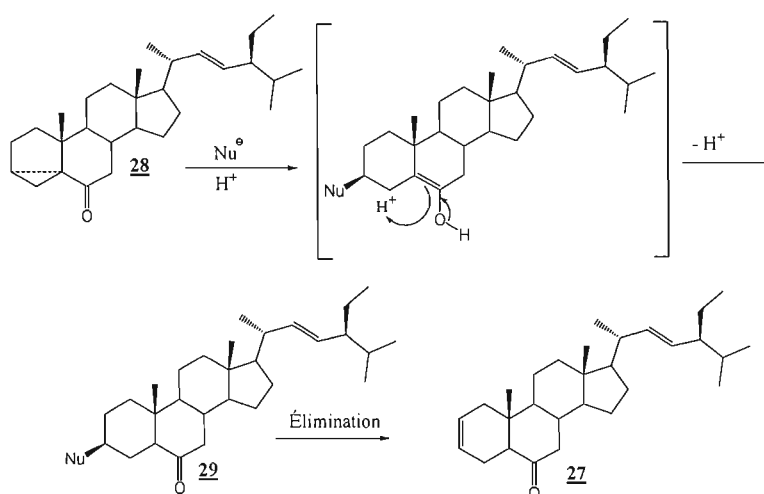
On y remarque en effet que les quatre brassinostéroïdes possèdent tous la même chaîne alkyle en C-17 (on se rappellera qu'il existe plusieurs différences possibles dans les chaînes alkyles de ces stéroïdes, section 1.2 et 1.5.1). Ceci permet de grandement simplifier la synthèse car ce fragment des molécules cibles étant identiques dans chacune d'entre elles, sa mise en place devra nécessairement impliquer un intermédiaire de synthèse ou un produit de départ très similaire dans tous les cas. Le défi est maintenant de trouver cet intermédiaire nous permettant de réaliser la synthèse de ces quatre molécules. Idéalement nous devrions procéder à la rétrosynthèse de ces molécules jusqu'à l'obtention d'un produit commercialement disponible. De plus, il serait utile que ce produit de départ contienne déjà les centres chiraux difficiles à contrôler tel que ceux des jonctions de cycles ainsi que les méthyles et éthyles en C-21 et C-24. Cependant, sans connaître toutes les multiples possibilités de réarrangement dans les stéroïdes, cette voie peut mener rapidement à une impasse. Par exemple, attardons nous attentivement à **24**. On reconnaît rapidement la fonctionnalité *cis* diol en position C-2, C-3 et C-22, C-23. Sans trop se tromper, il est possible de réaliser une désunion de type C-O menant au diène **27** car la dihydroxylation d'un alcène est une réaction connue pour la mise en place de la fonctionnalité *cis*-diol (figure 2.2).



**Figure 2.2** Désunion C-O de la fonctionnalité *cis* diol

Toutefois, aucune réaction simple ne nous permet de réaliser des désunions connues et de remonter à un produit de départ simple à partir de ce diène. De même, à première vue il est tout aussi impossible de trouver un moyen de relier **27** à **25**. Heureusement plusieurs chimistes ont travaillé sur la chimie des brassinostéroïdes. La clef de la plupart de ces synthèses est l'espèce **28** (figure 2.3)

tel que montré par McMorris<sup>(31,32)</sup>, Carmes<sup>(33)</sup> et Mori<sup>(34)</sup> pour n'en nommer que quelques uns. La cétone pentacyclique **28** a comme particularité de permettre l'insertion d'un nucléophile en position C-3. Lors de l'attaque du nucléophile les électrons du lien C-3-C-5 sont refoulés dans le carbonyle et la tautomérisation de l'énol formé mène rapidement à **29**. Il est maintenant simple de penser que selon la nature du nucléophile, il pourrait être possible de l'expulser suite à son insertion et de mener à la formation de **27** (figure 2.3).

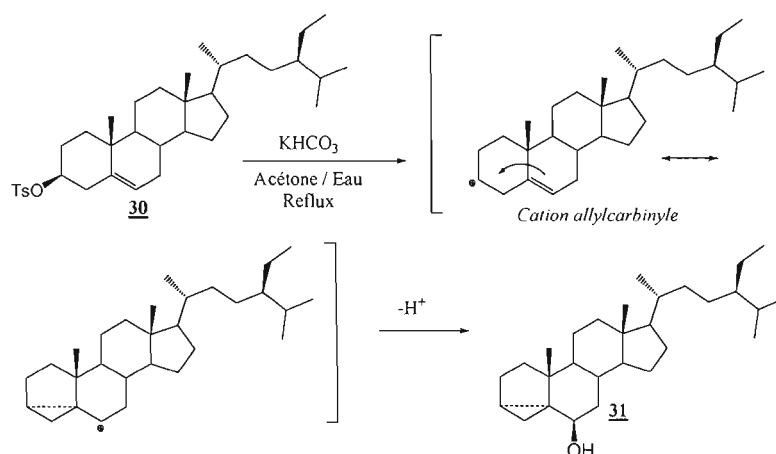


**Figure 2.3** Insertion nucléophile sur **28** suivie d'une élimination menant à la formation du diène **27**

Selon cette même figure, on remarque aussi que si nous étions en mesure de réaliser l'insertion d'un groupement OH de façon à obtenir **29** OH comme nucléophile (Nu), nous aurions ainsi un intermédiaire fort utile dans l'obtention de **25**. Bref, **28** serait une molécule fort importante dans l'insertion soit d'un seul OH ou dans l'insertion de deux OH (en *cis*) en position C-2 et C-3 du système stéroïdien. Encore une fois, **28** n'est pas un produit commercial, il faut donc trouver une nouvelle désunion de façon à obtenir un produit disponible sur le marché. La solution cette fois-ci provient d'un réarrangement particulier présent chez le cholestérol et ces dérivés. Winstein<sup>(35,36)</sup> et Adams ont montré que lorsque le tosylate de

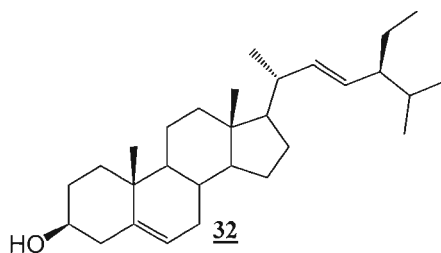


cholestérol **30** est porté à reflux dans un mélange acétone/eau en présence de bicarbonate de potassium, on observe la formation de l'alcool **31** possédant le cycle à 3 membres (figure 2.4). Cette réaction est communément appelée réarrangement *i* stérol (ou réarrangement iso stérol). Elle implique le départ du tosylate en C-3 suivie de la formation d'un cation allylcarbinyle (la charge positive étant répartie entre les deux extrémités du système). L'eau (ou OH<sup>-</sup>) venant ensuite attaqué en position C-6 pour former l'alcool **31**.



**Figure 2.4** Réarrangement *i* stérol du tosylate **30** selon Winstein et Adams

Ce réarrangement nous permet de conclure deux choses importantes. Tout d'abord, il est possible grâce à un réarrangement *i* stérol d'obtenir un alcool pentacyclique en C-6 qui suite à une simple oxydation nous permettrait d'obtenir une cétone pentacyclique comme **28**. Deuxièmement, la mise en place de cette réaction requiert que le produit de départ possède un alcool en C-3 (que l'on puisse tosyler) et possède un lien C=C en C-5. De plus, il ne faut pas oublier que selon notre désunion C-O initiale, le produit de départ idéal doit posséder une insaturation en C-22,C-23. Bref, on aimerait idéalement utiliser **32** (figure 2.5), lequel est littéralement le cholestérol mis à part l'insaturation sur sa chaîne alkyle. Ce produit est bel et bien disponible commercialement, il est connu sous le nom trivial de stigmastérol (Acros organics).



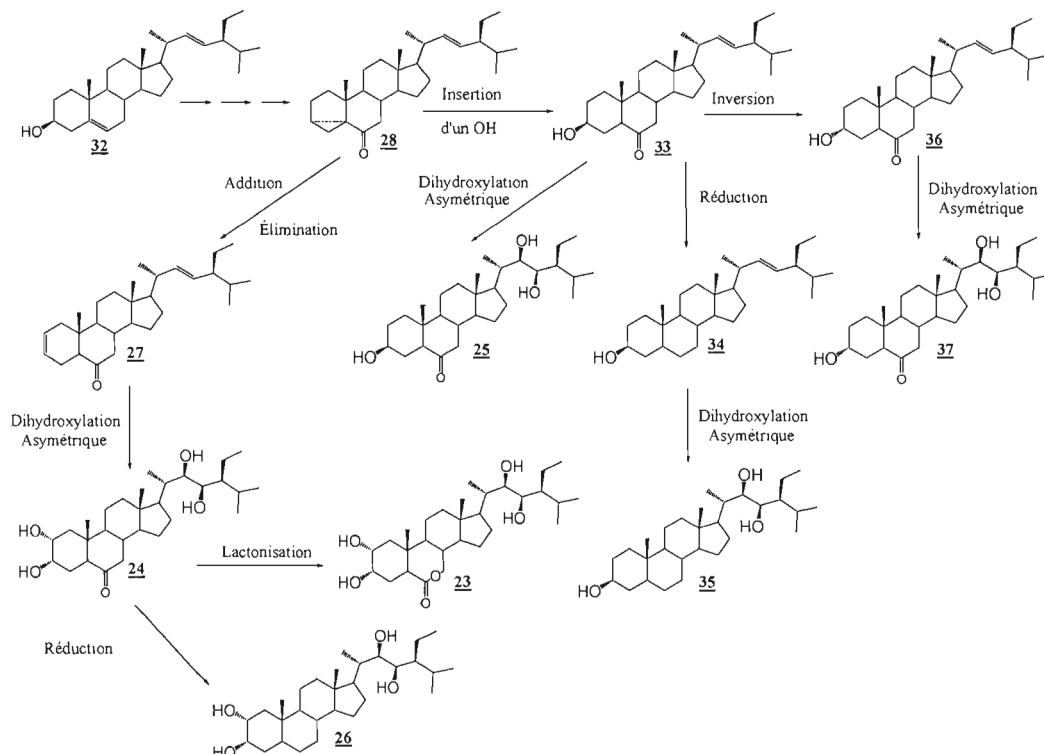
**Figure 2.5** Structure du stigmasterol, le produit de départ de nos synthèses

Comme nous venons de le voir, grâce à la rétro synthèse et aux travaux de plusieurs chercheurs nous avons réussi à choisir un excellent produit de départ pour réaliser nos synthèses. Abordons maintenant notre plan général permettant d'obtenir nos quatre molécules cibles à partir de cet analogue du cholestérol.

## 2.2 Plan de synthèse

Comme nous venons de le voir à la section précédente, le stigmasterol devrait nous permettre d'obtenir la 28-homocastastérone (**24**). La figure de la page suivante nous montre maintenant comment obtenir nos trois autres molécules cibles à partir de ce même produit de départ ainsi que certains autres dérivés qui pourront aider à long terme dans l'élaboration d'un modèle RSA. Ainsi, en partant du stigmasterol (**32**), nous allons préparer la cétone pentacyclique **28** (chapitre 3) tel qu'expliqué dans la section précédente. À partir de **28** nous pourrons ensuite réaliser l'insertion d'un nucléophile en position C-3 sur le cycle à 3 membres du stéroïde pour ensuite procéder à son élimination de façon à générer le diène **27**. La double dihydroxylation asymétrique en C-2, C-3 et C-22,C-23 du diène **27** devrait nous permettre d'obtenir la 28-homocastastérone (**24**) (chapitre 3). À partir de **24**, il sera possible de réaliser une réduction du C=O en C-6 de manière à générer le 6-deoxocastastérone (**26**) (chapitre 4). Toujours à partir de **24**, l'oxydation de Baeyer-Villiger devrait nous permettre de mettre en place la fonctionnalité particulière 7-oxolactone et donc

d'obtenir le 28-homobrassinolide (**23**) (section 2.3). Si on retourne maintenant à notre cétone pentacyclique **28**, l'insertion d'une fonction alcool sur le cycle à 3 membres devrait nous permettre d'obtenir **33**, qui une fois dihydroxylé devrait conduire à l'homotéastérone (**25**).



**Figure 2.6** Notre plan de synthèse initial pour l'obtention des molécules cibles

Ce plan nous permet donc d'obtenir en théorie nos quatre molécules cibles que sont **23**, **24**, **25** et **26**. Cependant, il laisse aussi place à la formation d'analogues synthétiques qui pourraient se révéler intéressant à tester. Comme nous avons pu remarquer à la section 1.3, l'activité biologique des brassinostéroïdes chez les plantes dépend fortement de l'orientation et de la présence des fonctions alcools sur le brassinostéroïde. C'est pourquoi nous avons pensé réaliser la synthèse de **35** et **37**. On remarque rapidement que **37** n'est simplement que l'épimère de **25**, c'est-à-dire que seul le centre chiral de l'alcool en C-3 est modifié. De plus, la formation de

ce produit devrait être très simple à réaliser. En effet, l'inversion de l'alcool en C-3 de **33** par la réaction de Mitsunobu<sup>(37)</sup> (chapitre 4) devrait fournir son diastéréoisomère **36** qui une fois dihydroxylé devrait mener à **37**. Dans un même ordre d'idée, la réduction de **33** suivie d'une dihydroxylation devrait mener à l'obtention de **35** qui est un analogue de **26** ne possédant qu'un seul OH. L'évaluation du potentiel neuroprotecteur de toutes ces molécules devrait nous permettre d'élaborer à long terme un modèle RSA intéressant. Avant de passer directement à la synthèse, il nous faut toutefois discuter de quelques sujets importants qui font eux aussi parti des stratégies de synthèse. Notamment la raison pour laquelle nous devons utiliser une dihydroxylation asymétrique et celle pour laquelle la réaction de Baeyer-Villiger devrait bel et bien donner la 7-oxolactone de manière régiosélective.

### 2.3 Régiosélectivité de la réaction de Baeyer-Villiger chez les précurseurs des brassinostéroïdes

À première vue, il est surprenant de croire que la réaction de Baeyer-Villiger sur **24** devrait donner **23**. Pourtant c'est bien le résultat observé par plusieurs chimistes des stéroïdes<sup>(31,32,33,34)</sup>. Pour comprendre cette anomalie, il faut d'abord faire un bref rappel de la réaction de Baeyer-Villiger. Elle met en jeu l'addition d'un peracide sur le lien double d'une cétone, suivi de la migration d'un groupement alkyle de manière à expulser la partie carboxylate du peracide. Globalement, on observe l'insertion d'un oxygène en  $\alpha$  du carbonyle de la cétone. Il faut noter que cette insertion est régiospécifique tel que démontré par Clayden<sup>(38)</sup> dans son traité de chimie organique (**Schéma 1**).

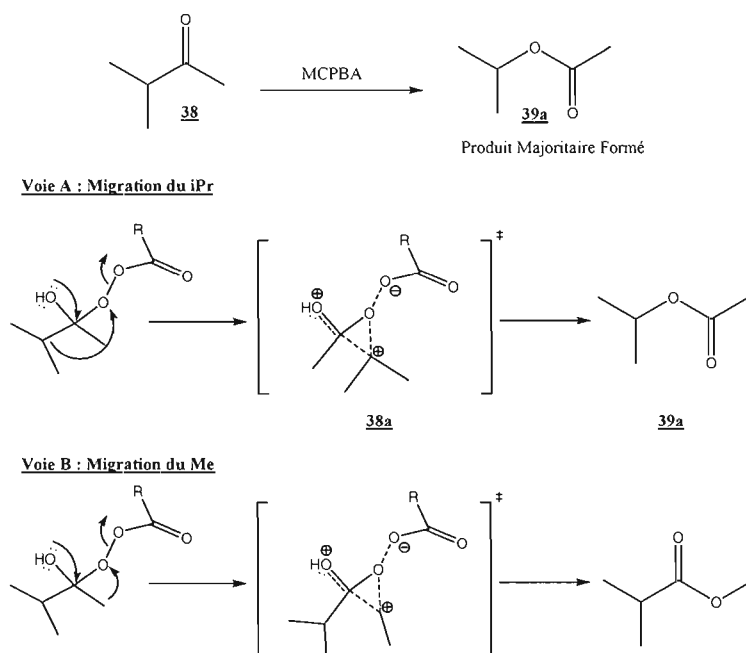
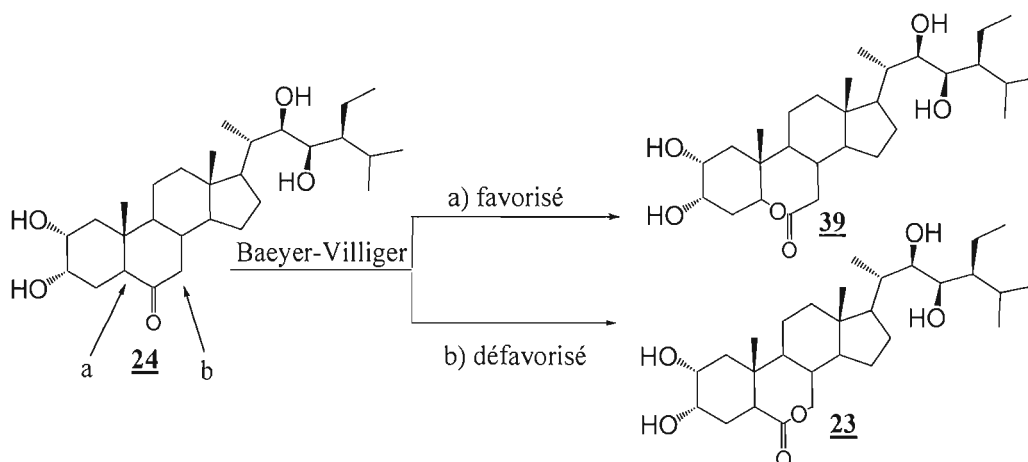


Schéma 1

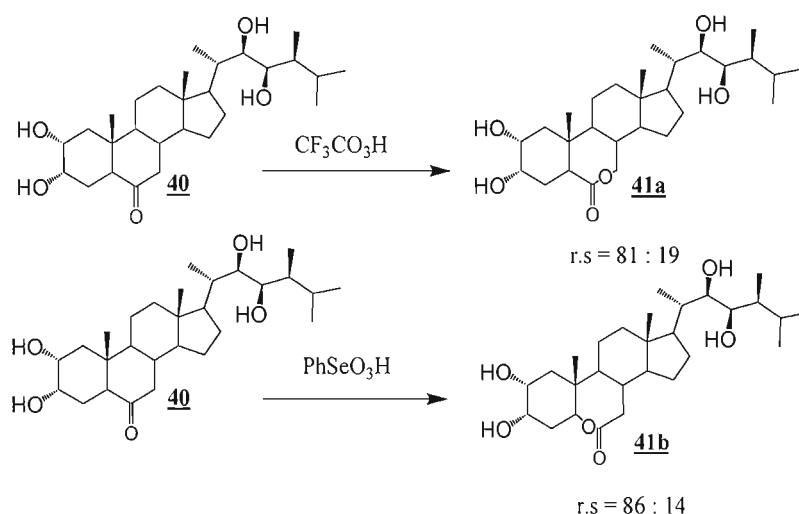
Ainsi, si on traite le 3-méthylbutan-2-one (**38**) avec du MCPBA, le seul produit obtenu est l'ester **39a** (voie A) et non le **39b** (voie B). La raison principale étant l'aptitude migratoire des groupements lors du réarrangement. La figure de la page précédente montre bien les 2 possibilités lors de la migration. Les deux états de transition découlant de ces migrations sont très différents du point de vue énergétique. En effet, dans l'état de transition **38a** on remarque que la charge positive partielle étendue est plus stabilisée que dans l'état de transition **38b** car un groupement isopropyle permet une meilleure stabilisation par hyperconjugaison qu'un groupement méthyle. Il va donc de soi que l'état de transition **38a** sera favorisé énergétiquement au détriment de **38b**. Ainsi, le produit principal résultant lors de l'oxydation de Baeyer-Villiger sera celui résultant de la migration du groupe le plus apte à stabiliser la charge positive partielle de l'état de transition. L'aptitude migratoire diminue dans l'ordre aryle > alkyle tertiaire > alkyle secondaire > alkyle primaire. Or, si on applique cette logique à **24**, nous devrions plutôt obtenir **39** et non

**23** car le carbone a devrait nécessairement migrer plus facilement que le carbone b (figure 2.7).



**Figure 2.7** Résultat prédit lors de la réaction de Baeyer-Villiger sur **24** en appliquant la logique de l'aptitude à la migration des groupes alkyles

Comment alors expliquer les résultats expérimentaux qui défient la logique de l'aptitude migratoire? Encore à ce jour l'explication n'est pas claire, cependant Takatsuto<sup>(39)</sup> et Back<sup>(40)</sup> ont apporté certains résultats intéressants. Takatsuto a d'abord montré que la régiosélectivité dépend du type de substituant en C-2 et C-3. En effet la présence de groupements oxygénés (OH, OR, OAc, OTs) en C-2 et/ou C-3 mène à l'obtention du produit désiré (anti Baeyer-Villiger) alors que la présence de groupements alkyles (ou l'absence de groupement) mène au produit non désiré (Baeyer-Villiger). Près de dix ans plus tard Back montra que le type d'oxydant utilisé lors du Baeyer-Villiger influence aussi l'issue de la réaction. Par exemple, lorsque Back traite **40** avec  $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$  il obtient principalement le régioisomère désiré **41a**. Cependant, lorsqu'il répète la même transformation en utilisant cette fois-ci  $\text{PhSeO}_3\text{H}$  comme oxydant, il obtient maintenant le régioisomère **41b** respectant l'aptitude migratoire des groupes alkyles (figure 2.8).

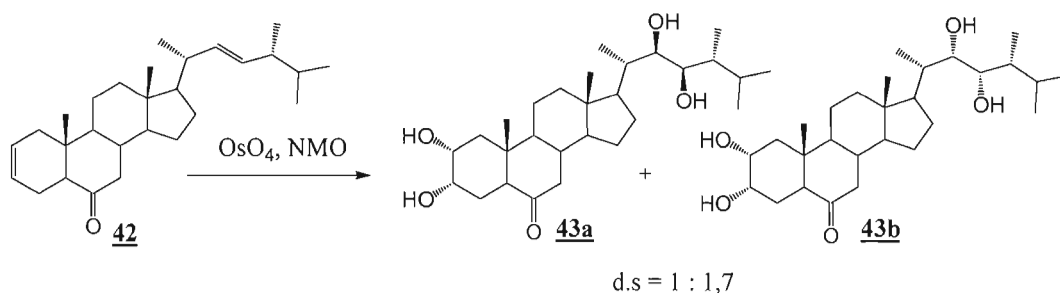


**Figure 2.8** Effet du changement de l'oxydant dans la régiosélectivité de la réaction de Baeyer-Villiger sur **40** selon Back

Cependant même si les résultats obtenus par Takatsuto et Back sont fort intéressants, aucune explication formelle n'a encore été donnée à ce jour pour décrire la régiosélectivité obtenue. Cependant cette brève discussion nous permet maintenant de connaître une méthode pour obtenir le régioisomère 7-oxolactone désiré. Ainsi, la réaction de Baeyer-Villiger sur un intermédiaire de synthèse possédant des fonctions OH en C-2 et C-3 (ou seulement en C-3) avec  $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$  devrait conduire majoritairement à la 7-oxolactone désirée même si celle-ci n'est pas le produit normalement attendu lors d'une oxydation de type Baeyer-Villiger. Une autre réaction est très importante à étudier avant de commencer la synthèse des molécules : la dihydroxylation asymétrique. Comme nous le verrons à la section suivante l'utilisation d'un auxiliaire chiral sera requis afin d'obtenir nos molécules cibles.

## 2.4 La nécessité d'utiliser la dihydroxylation asymétrique dans l'obtention du stéréoisomère désiré

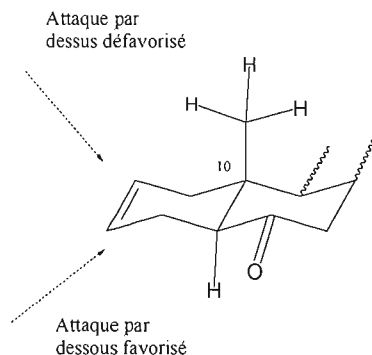
Une de nos stratégies de synthèse implique la dihydroxylation du diène **27** de manière à obtenir la 28-homocastastérone (**28**). Les travaux de plusieurs chercheurs montrent que les dihydroxylation classiques réalisées avec  $\text{OsO}_4$  permettent bien de réaliser la double dihydroxylation. Cependant la stéréochimie observée n'est pas en faveur du produit désiré. Par exemple, dans la synthèse du 24-épibrassinolide, Ikekawa<sup>(12)</sup> a montré que lorsque l'on traite le diène **42** avec  $\text{OsO}_4$  en présence d'un co-oxydant (ici NMO) on obtient bel et bien la 24-épicastastérone (**43a**) avec la stéréochimie 22(*R*), 23(*R*). Cependant l'isomère désiré n'est pas celui qui est prédominant (figure 2.8).



**Figure 2.9** Sélectivité observée lors de la formation de la 24-épicastastérone par dihydroxylation du diène **42** avec  $\text{OsO}_4$  selon Ikekawa

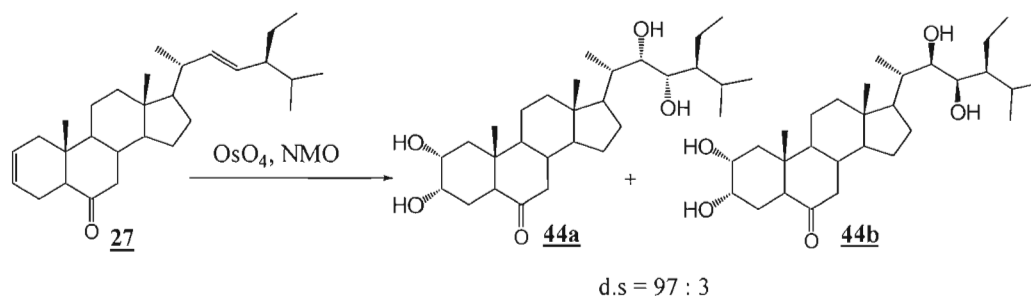
Dans la figure précédente on remarque tout d'abord que le problème de sélectivité ne se fait ressentir qu'en C-22 et C-23, la stéréochimie en C-2 et C-3 étant correcte. La stéréochimie en C-2 et C-3 est clairement contrôlée par un effet stérique présent sur le diène **42** (figure 2.10).





**Figure 2.10** Hypothèse sur la sélectivité en C-2, C-3 lors de la dihydroxylation avec  $\text{OsO}_4$  du diène 42

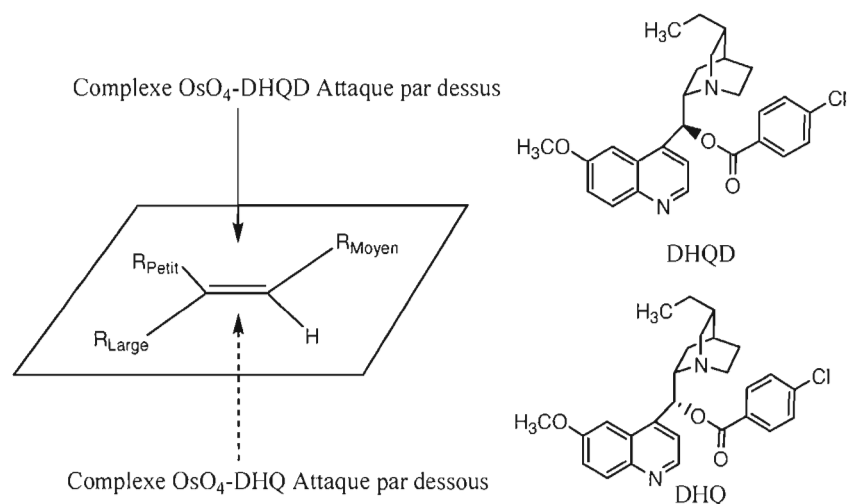
On observe en effet que le méthyle en C-10 bloque la face du dessus de la molécule. La réaction se déroulant dans des conditions cinétiques à température pièce, il est alors probable que  $\text{OsO}_4$  s'approche du diène par la face du dessous. Il n'existe cependant pas de simple explication pour expliquer le manque de sélectivité observée sur la chaîne alkyle. Cependant la présence d'un groupement alkyle en C-24 a sûrement un rôle à jouer. Dans la 24-épicastastérone (43a) (figure 2.9) on remarque que le groupement alkyle en C-24 a une configuration (*R*), il pointe par-dessous du plan comme pour le groupement méthyle en C-21. Quel serait l'effet sur la sélectivité si ce groupement en C-24 avait une configuration (*S*) (opposé à celle du Me en C-21) comme dans le cas du 28-homobrassinolide (23)? Mori<sup>(34)</sup> s'est attardé à ce problème et le résultat est surprenant. Lorsqu'il traita le diène 27 avec  $\text{OsO}_4$  dans des conditions courantes, il observa que la castastérone (44a) (l'isomère non désiré) était formé de manière fortement stéréospécifique (figure 2.11).



**Figure 2.11** Sélectivité observée lors de la formation de **44a** par dihydroxylation du diène **27** avec  $\text{OsO}_4$  selon Mori

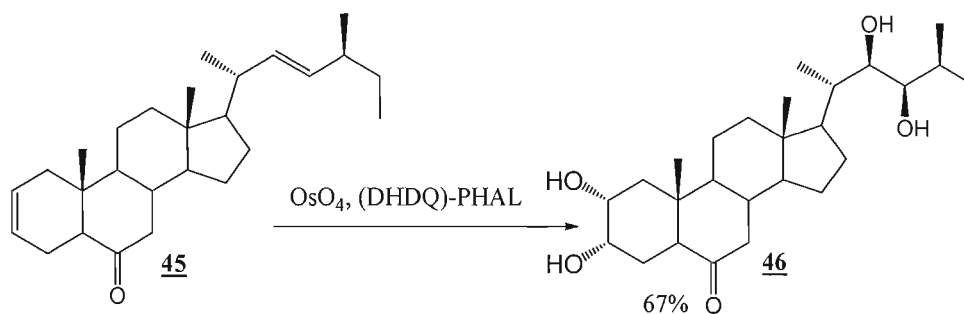
Même si à notre connaissance il n'y a pas d'explication certaine sur la raison de cette sélectivité on peut tirer une conclusion importante des travaux d'Ikekawa et Mori. Lorsque le groupement en C-24 est (*S*), la dihydroxylation fournit un mélange des deux isomères possibles sur la chaîne alkyle alors que lorsqu'il est (*R*) on observe seulement la formation de l'isomère 22(*S*), 23(*S*) (c'est probablement pourquoi seul le 24-épibrassinolide (naturel) et le 22(*S*), 23(*S*)-homobrassinolide (synthétique) sont disponible commercialement). À la lumière de cette information, il nous faut donc trouver une version asymétrique de cette dihydroxylation.

Vers la fin des années 80, Sharpless<sup>(41,42)</sup> et son groupe de recherche mirent au point une méthode permettant de dihydroxyler de manière stéréospécifique plusieurs alcènes. La technique utilise des auxiliaires chiraux de type quinine qui viennent se lier à l'osmium. L'agent oxydant devient donc chiral et possède maintenant, en plus, une certaine contrainte stérique lui permettant de favoriser une stéréosélection. La figure suivante montre le schéma général de la dihydroxylation de Sharpless. Ainsi, lorsqu'un alcène est traité soit avec l'auxiliaire chiral DHQD ou soit avec l'auxiliaire chiral DHQ lors d'une dihydroxylation avec  $\text{OsO}_4$ , on devrait en théorie observer une sélection favorisant la mise en place des OH par-dessus ou par-dessous, respectivement, dans le système de référence des groupements alkyles ( $R_{\text{petit}}$ ,  $R_{\text{moyen}}$ ,  $R_{\text{large}}$ ) tel que présenté à la figure 2.12.



**Figure 2.12** Dihydroxylation asymétrique de Sharpless

La stéréosélectivité est dépendante à la fois de l'auxiliaire chiral et du type de groupements alkyles sur l'alcène. Même si l'exemple précédant montre un alcène trisubstitué, Sharpless montra que sa méthode donne aussi des résultats intéressants pour les alcènes disubstitués et mono substitués. Cependant, les résultats peuvent varier beaucoup selon la nature des groupements alkyles et la stéréochimie de l'alcène<sup>(43)</sup>. C'est une des raisons qui nous a poussé à scruter la littérature afin de trouver un exemple de l'utilisation de cette réaction dans la synthèse des brassinostéroïdes. Un exemple intéressant que nous avons trouvé est celui de Watanabe<sup>(44)</sup>. Lorsqu'il procéda à la dihydroxylation du diène **45** avec un dérivé du DHQD (un auxiliaire chiral plus récent utilisant un ligand de type phtalazine), il obtint à 67% de rendement la 26-norcastastérone (**46**) avec la stéréochimie désirée 22 (*R*), 23 (*R*) comme produit majoritaire (figure 2.12).



**Figure 2.13** Dihydroxylation asymétrique de Sharpless réalisé sur **45** par Watanabe

Cet exemple est intéressant car on remarque que dans le diène **45**, il y a un méthyle en C-24 avec la configuration (*S*). Nous avons vu précédemment que Mori n'obtenait que des traces de l'isomère **22** (*R*), **23** (*R*) dans ses conditions (éthyle en C-24). Voilà probablement la raison qui a poussé Watanabe à utiliser la dihydroxylation de Sharpless. De plus, le résultat est très prometteur pour nous car **45** ressemble fortement à **24**. Ainsi, on pourrait s'attendre à obtenir environ 70% de rendement pour notre réaction de dihydroxylation, puisque nos molécules sont très similaires.

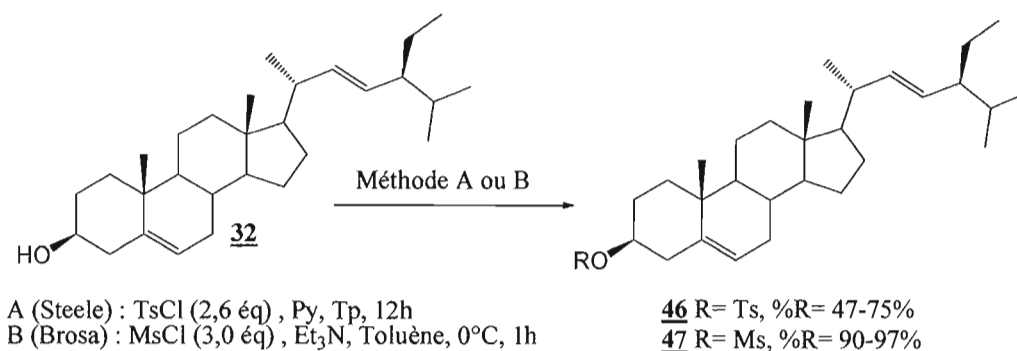
En bref, nous avons maintenant examiné le plan de synthèse initial que nous avons appliqué dans la synthèse des molécules cibles. Aussi, nous avons discuté des particularités de deux réactions clef de nos synthèses soit la dihydroxylation asymétrique ainsi que l'oxydation de Baeyer-Villiger. Le prochain chapitre traitera donc de nos résultats sur la synthèse du 28-homocastastérone (**24**).

## CHAPITRE III

### SYNTHÈSE DE LA 28-HOMOCASTASTÉRONE

#### 3.1 Tosylation et mésylation du stigmastérol **32**

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, notre plan de synthèse de la 28-homocastastérone a comme première étape la formation d'un tosylate en position C-3 du stigmastérol afin d'avoir un groupe partant nous permettant d'effectuer le réarrangement *i* stérol requis dans la synthèse. Nous avons donc dans un premier temps effectué la réaction dans les conditions de Steele<sup>(45)</sup> en traitant le stigmastérol (**32**) avec le chlorure de l'acide *p*-toluènesulfonique (figure 3.1, méthode A).



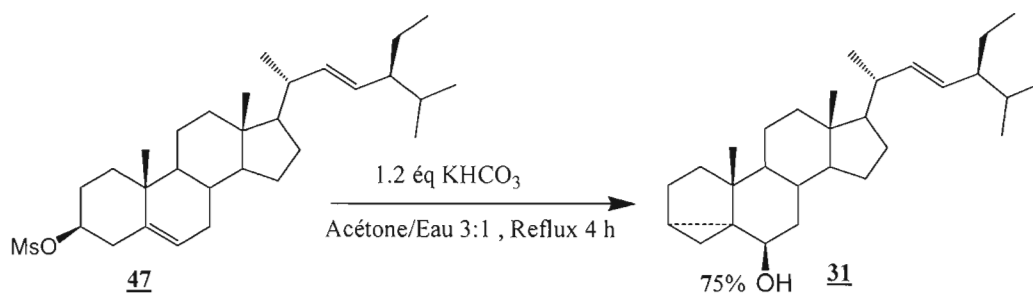
**Figure 3.1** Mésylation et Tosylation du Stigmastérol (**32**)

Les premiers essais n'étaient guère satisfaisants, le spectre RMN <sup>1</sup>H du tosylate **46** obtenu montrait la présence de plusieurs contaminants mineurs. Plusieurs recrystallisations successives nous ont permis d'obtenir un produit d'une pureté

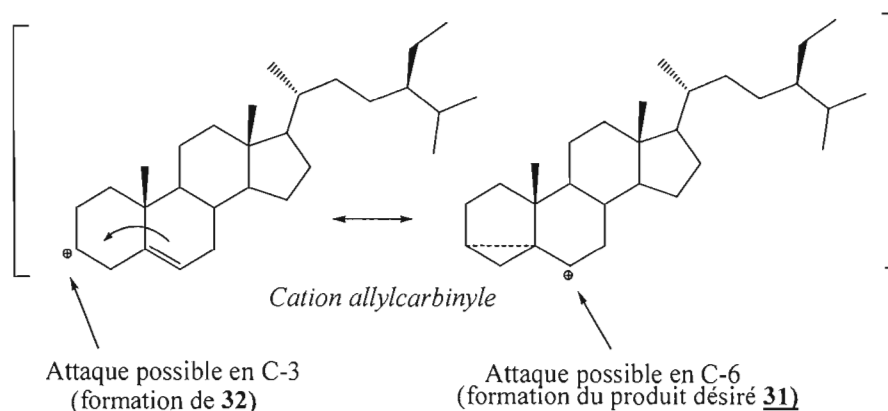
adéquate avec un rendement moyen de 47% ce qui n'était guère acceptable pour une réaction si simple qui est de plus la première étape de la synthèse. Par la suite, nous avons été en mesure d'améliorer ce rendement à 75% en prenant soin de recrystalliser le TsCl dans l'hexane avant son utilisation. Ceci minimisait la présence des impuretés en RMN  $^1\text{H}$  et l'utilisation d'une seule recrystallisation était nécessaire pour obtenir un produit pur. Cependant, le rendement était encore un peu trop faible pour la première étape de notre synthèse et nous avons donc porté notre attention sur une méthode alternative mis au point par Brosa<sup>(33)</sup> mettant un jeu un groupement mésylate au lieu d'un groupement tosylate (figure 3.1, méthode B). Dans ces conditions il fut possible d'obtenir le mésylate de stigmastérol **47** avec un rendement de 90-97% avec une pureté acceptable sans avoir recours à aucune technique de purification. Notons aussi que la mésylation effectuée dans les conditions de Carmes est beaucoup plus rapide que la tosylation de Steele (1h vs 12h). De plus, comme nous verrons à la section suivante, le réarrangement *i* stérol est beaucoup plus simple à effectuer sur **47** que sur **46**.

### 3.2 Réarrangement *i* stérol du mésylate de stigmastérol **47**

Une fois **47** obtenu, nous avons procédé au réarrangement *i* dans les conditions de Winstein<sup>(35,36)</sup> et Adams (section 2.1). La réaction est simple à mettre en œuvre et ne requiert que de porter à reflux le mésylate de stigmastérol **47** en présence de 1,2 éq de bicarbonate de potassium dans un mélange acétone/eau 3 :1 pendant 4h. Le produit obtenu est facilement purifié par chromatographie éclair et donne un rendement satisfaisant de 75% en **31** (figure 3.2). Malheureusement la réaction forme aussi en moyenne 10 à 12% de stigmastérol (**32**). La formation de stigmastérol peut paraître surprenante, mais il faut se souvenir que un des intermédiaires de la réaction est un cation allylcarbinyne (section 2.1 et figure 3.3) dont la charge positive est délocalisée de part et d'autre entre le carbone en C-3 et celui en C-6.



**Figure 3.2** Réarrangement *i* du mésylate **47** en alcool **31**



**Figure 3.3** Possibilité d'attaque par un nucléophile en C-3 et en C-6 sur le cation allylcarbinylyle du stigmastérol

Même si les expériences de Weinstein et Adams ont montré que le produit le plus stable est celui résultant de l'attaque de l'eau en C-6, il est tout de même logique d'observer comme produit mineur le produit résultant de l'attaque en C-3 qui en théorie mène à un produit moins stable. D'ailleurs, dans toutes les réactions de ce genre<sup>(31,45)</sup>, on observe bien comme produit mineur celui résultant de l'attaque en C-3. À noter que la formation des deux produits (**31** et **32**) est stéréosélective tel que confirmé par les spectres RMN<sup>1</sup>H des deux produits. En effet l'alcool résultant dans les deux cas a sa fonction OH sur un système cyclique fixe et ce qui nous permet à l'aide de la règle de Karplus<sup>(46)</sup> (nous verrons en détails cette règle et ces

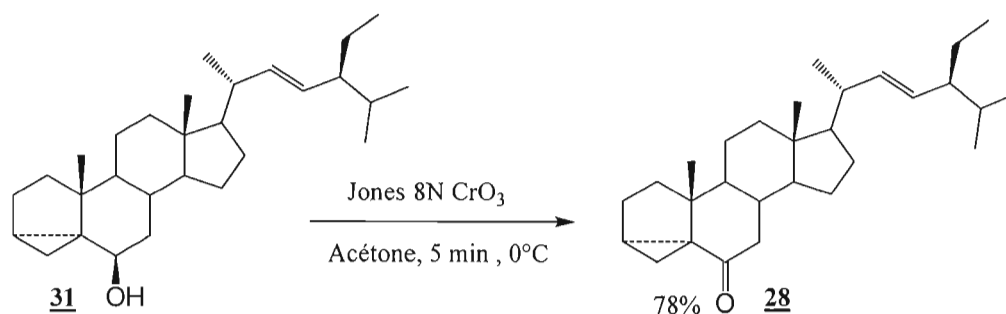
conséquences au chapitre 4) de confirmer la stéréochimie de l'hydrogène sur le carbone porteur de cette fonction OH. Ainsi, l'hydrogène liée sur le carbone portant la fonction OH devrait produire des signaux avec des constantes de couplage différentes en RMN  $^1\text{H}$  selon que celui-ci se retrouve en position axiale ou équatoriale. Or, tant sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du stigmastérol régénéré que sur celui de **31** on ne voit qu'un seul multiplet dans chacun des cas. Aussi comme nous verrons au chapitre 4, lorsque l'alcool change de configuration stéréochimique son déplacement chimique sera aussi fortement affecté. Ceci permet à tout le moins de conclure dans les deux cas qu'un seul isomère est majoritairement formé. Cependant, nous n'avons pas porté une attention importante à la quantification de la sélectivité observée lors du réarrangement car de toute façon la stéréochimie sur le centre chiral en C-6 sera détruite lors de l'oxydation de l'alcool secondaire en cétone à l'étape suivante. Néanmoins une explication de la raison de cette sélectivité n'en demeure pas moins intéressante et s'explique par la délocalisation de la charge positive du carbocation allylcarbinyne. Notre hypothèse est que l'attaque en C-6 est sous contrôle stéréoélectronique et se produit de manière axiale sur le lien  $\pi$  en C-6 de manière à passer par un état de transition de type chaise (plutôt qu'un état de transition de type bateau) alors que l'attaque en C-3 se fait plutôt comme une  $\text{S}_\text{N}'$ . En effet, on peut imaginer une attaque dorsale par-dessus car le pont en C-3 et C-5 est par dessous. Nous verrons au Chapitre 4 que l'insertion d'un nucléophile en position C-3 sur la cétone **28**, possédant ce même pont entre C-3 et C-5, ne mène qu'à la formation d'un seul épimère en C-3 et que la stéréochimie obtenue est en accord avec un mécanisme  $\text{S}_\text{N}'$  (la stéréochimie du produit d'addition sur **28** en C-3 fut confirmée par une expérience n.O.e). À noter aussi que la réaction est plus pratique lorsque qu'elle est effectuée avec le mésylate **47** plutôt qu'avec le tosylate **46**. La méthode de Steele pour le réarrangement est très gourmande en solvant étant donné que l'on doit réussir à solubiliser le tosylate **46**, un stéroïde avec un groupement aromatique peu polaire, dans un mélange de solvant polaire qu'est celui de la réaction (Acétone/Eau). Ainsi, pour 5 g de tosylate **46**, il faut près de 2 L de solvant pour effectuer la réaction alors que pour le mésylate **47** il n'en faut que 300 mL. Il est alors simple de comprendre les complications pour concentrer et pour



procéder à l'extraction de **46** dans ces conditions. Notons finalement que les rendements du réarrangement impliquant le mésylate **47** (75%) est semblable à celui obtenu avec le tosylate **46** (70%, 2 essais seulement à causes des problèmes cités ci-haut).

### 3.3 Oxydation de l'alcool **31** en cétone **28**

Une fois l'alcool réarrangé **31** obtenu, nous ne sommes plus qu'à une étape de notre précieuse cétone pentacyclique **28** qui nous servira dans plusieurs de nos synthèses. L'oxydation est relativement simple et ne requiert que très peu de précaution. En effet, l'alcool étant cyclique et secondaire, les risques de suroxydation sont très faibles. Ainsi l'utilisation de l'acide chromique de Jones<sup>(47)</sup> suffit amplement à réaliser cette transformation chimique (figure 3.4).



**Figure 3.4** Oxydation de l'alcool stéroïdien **31** en cétone **28**

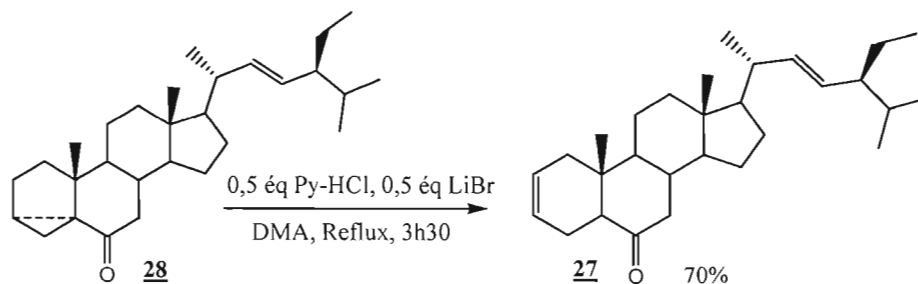
L'alcool est dissous dans l'acétone et placé dans un bain de glace et le réactif de Jones fraîchement préparé (voir section expérimentale) est ajouté goutte à goutte de la même manière qu'un titrage colorimétrique classique. En effet, le chrome (VI) de l'acide chromique a une coloration rouge et lorsqu'il oxyde **31** il gagne deux électrons dans le processus et passe sous forme de chrome (IV). Par la suite, il est connu que par certains mécanismes complexes ce chrome (IV) se dismute en chrome (III) qui lui possède une coloration verte dans le mélange réactionnel<sup>(48)</sup>.

Ainsi, au fur et à mesure que l'on ajoute goutte à goutte le réactif de Jones, la coloration du mélange passe du rouge au vert et on poursuit l'ajout jusqu'à ce que la coloration rouge persiste (correspondant à un excès de chrome). La réaction comme telle ne prend pas plus de 10 min à mettre en place et à effectuer et procure un rendement très bon en **28** soit de 78% (purifié par chromatographie éclair). À noter cependant que même s'il est facile de réussir à séparer le produit des multiples impuretés sur CCM dans des mélanges de solvants courants tel que Hexane/Acétone, la séparation sur colonne n'en est pas aussi simple. Nos nombreux essais nous ont montré que cet éluant ne réussissait pas à séparer convenablement le produit dans la colonne. Même si sur la CCM ils semblent séparables, les impuretés éluent avec le produit désiré lors de la chromatographie. Nous avons éventuellement découvert que le benzène était un bien meilleur éluant pour ce produit (et les produits subséquents). Plus tard nous avons remarqué dans la littérature que plusieurs chimistes utilisent des solvants aromatiques pour la purification de ce genre de produits ce qui nous laisse à tout le moins croire que ce problème est fréquent<sup>(33,44)</sup>. Finalement, ajoutons que lors de la mise à l'échelle, nous avons été en mesure de montrer qu'en partant du stigmastérol (**32**) il est possible de réaliser toute la séquence réactionnelle jusqu'à **28** en ne purifiant seulement qu'au stade de l'oxydation avec un rendement global de 60% (3 étapes), ce qui est excellent comparé au 55% obtenu en purifiant à la fois au stade du réarrangement et au stade de l'oxydation.

### 3.4 Addition-Élimination sur **28** menant au diène **27**

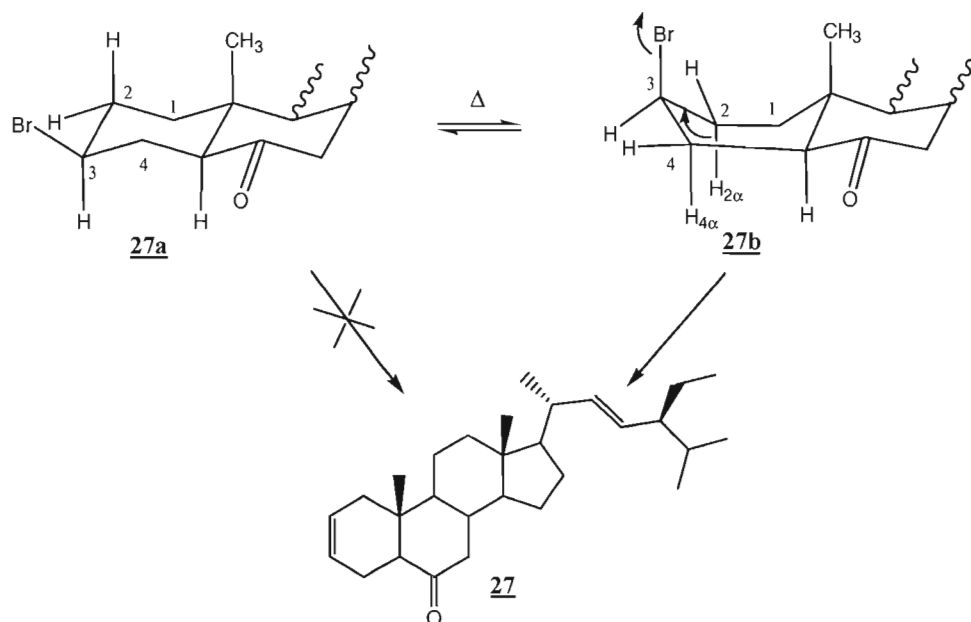
Avec la cétone **28** nous devrions être en mesure de générer le diène **27** qui est le précurseur direct de la 28-homocastastérone tel que présenté dans notre plan de synthèse (Section 2.2). Comme nous l'avons montré à la section 2.1, il est connu des chimistes que l'on peut procéder à l'insertion d'un groupement nucléophile en position C-3 sur la cétone **28**. À la section 3.2 nous avons également vu que cette addition peut être considérée comme une  $S_N1$  dans laquelle les électrons du pont C-3, C-5 agissent comme groupe partant. Idéalement ce que nous désirons faire est de

réaliser l'insertion d'un groupement en C-3 et de réaliser son élimination in situ de façon à générer le diène **27**. Plusieurs réactions de ce genre ont été réalisées sur divers précurseurs de brassinostéroïdes<sup>(31,32,33,34)</sup>. Ainsi, dans les conditions classiques pour cette réaction, la cétone **28** fut traitée avec LiBr et Py-HCl et portée à la température du reflux dans du N,N-diméthylacétamide pendant 3h30 (figure 3.5).



**Figure 3.5** Addition-Élimination sur la cétone **28** conduisant au diène **27**

Le chlorhydrate de pyridine joue ici le rôle de catalyseur acide permettant la protonation du carbonyle en C-6 ce qui active la position C-3 vis-à-vis des attaques d'un nucléophile. Il peut paraître étrange d'utiliser un solvant comme le DMA pour réaliser la réaction car son point d'ébullition ( $T_{\text{éb}} = 153\text{-}154^{\circ}\text{C}$ ) est très élevé ce qui implique nécessairement qu'il est difficile de s'en débarrasser. Cependant, son utilisation ou celle d'un solvant avec un point d'ébullition tout aussi élevé est requise pour réussir à réaliser l'élimination. On se rappellera que pour réaliser une élimination de type  $E_2$ <sup>(49)</sup>, il faut que la molécule possède un hydrogène antipériplanaire à son groupe partant. Or, si le brome s'additionne à la manière d'une  $Sn'$ , le brome devrait attaquer par le dessus de la molécule et se retrouver en position équatoriale. Or, dans la conformation chaise du dérivé 3-Bromé **27a** (figure 3.6), il n'y aucun proton antipériplanaire dans l'entourage du brome (position C-2 et C-4).

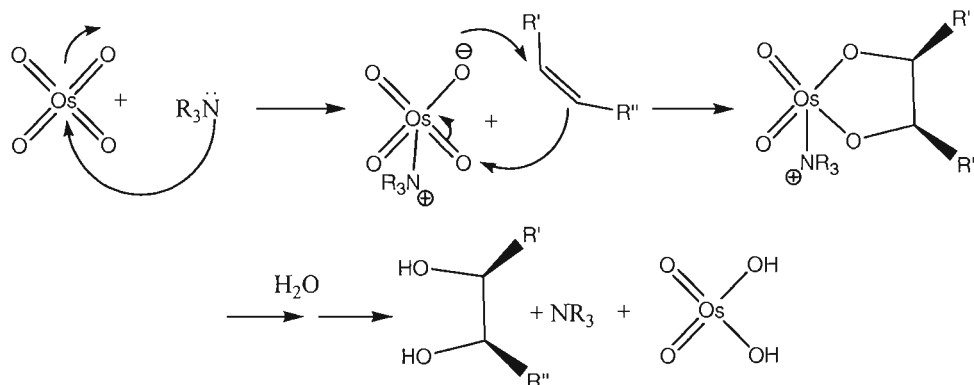


**Figure 3.6** Nécessité d'interconvertir **27a** en son conformère **27b** afin de réaliser la  $E_2$

Ainsi, pour réaliser l'élimination, il faudra que la forme chaise de **27a** se convertisse en sa forme bateau **27b** afin d'obtenir un conformère avec des protons antipériplanaires au brome ( $H_{2\alpha}$  et  $H_{4\alpha}$ ). Il est généralement admis que l'isomère chaise d'un cyclohexane est beaucoup plus stable que son pendant bateau. Or, ici l'interconversion sera nécessairement difficile étant donné que nous sommes dans un système à cycles fusionnés. Voilà donc pourquoi il faut donner beaucoup d'énergie au système pour réaliser cette interconversion (d'où l'utilisation du DMA comme solvant). Sur le conformère **27b** on remarque des protons avec la bonne orientation spatiale en C-2 et C-4. Cependant en C-4 l'arrachement devrait être moins favorisé pour des raisons stériques car nous sommes près de la jonction de cycle. Selon ces observations, seul l'arrachement en C-2 devrait être possible. Même la réaction à lieu dans le DMA (température élevée), il semblerait que ce soit le cas car le seul diène isolé de la réaction est **27** et ce avec 70% de rendement.

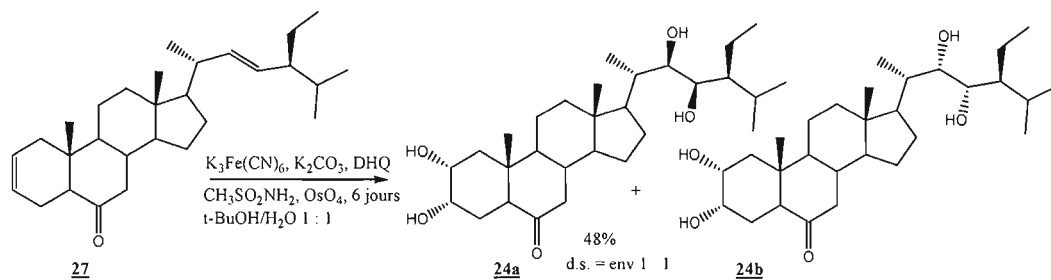
### 3.5 Dihydroxylation asymétrique du diène 27

Seule la dihydroxylation asymétrique nous sépare maintenant de la 28-homocastastérone (24). Comme nous avons vu à la section 2.4, nous devons utiliser une version asymétrique de la dihydroxylation de Upjohn<sup>(50)</sup> afin d'être en mesure d'insérer les deux OH en C-22 et C-23 avec la bonne stéréochimie. Dans un premier temps, nous avons traité le diène 27 avec les mélanges commerciaux de Sharpless<sup>(41)</sup> (en rajoutant 2,0 éq de méthanesulfonamide pour aider l'hydrolyse de l'osmate formé après la cycloaddition tel que décrit par Sharpless pour les alcènes terminaux ou encombrés) afin de réaliser la dihydroxylation. Cependant tant le AD-Mix  $\alpha$  que le AD-mix  $\beta$  n'ont pu mener à la formation de la castastérone désirée (24) (aucun changement en CCM après 25 jours de réaction). Nous avons cependant vite compris la raison de cette absence de réactivité. La raison principale vient du fait que les mélanges de dihydroxylation asymétriques du commerce sont composés à plus de 99%<sup>(41,42)</sup> de carbonate de sodium et d'hexacyanoferrate (III) de potassium. Ainsi, moins de 1% du mélange est constitué de l'auxiliaire chiral et du sel d'osmium. Or, il est connu que l'auxiliaire chiral permet à la fois de forcer une stéréosélection et d'activer l'osmium. Il est généralement admis<sup>(43)</sup> que le tétroxyde d'osmium a une forte affinité avec les amines tertiaires (on se rappellera que DHQ contient une amine tertiaire, section 2.4). Celles-ci s'additionnent sur l'osmium ce qui génère un oxygène chargé négativement qui vient faciliter la cycloaddition subséquente sur l'alcène cible (figure 3.7). Notre alcène étant particulièrement encombré par la partie stéroïde, il est donc logique de penser que l'utilisation d'une plus grande quantité d'auxiliaire chiral et l'utilisation d'un rapport molaire plus élevé en OsO<sub>4</sub> soit nécessaire pour réussir à le dihydroxyler.



**Figure 3.7** Activation du tétroxyde d'osmium pour la dihydroxylation d'alcène en utilisant une amine tertiaire

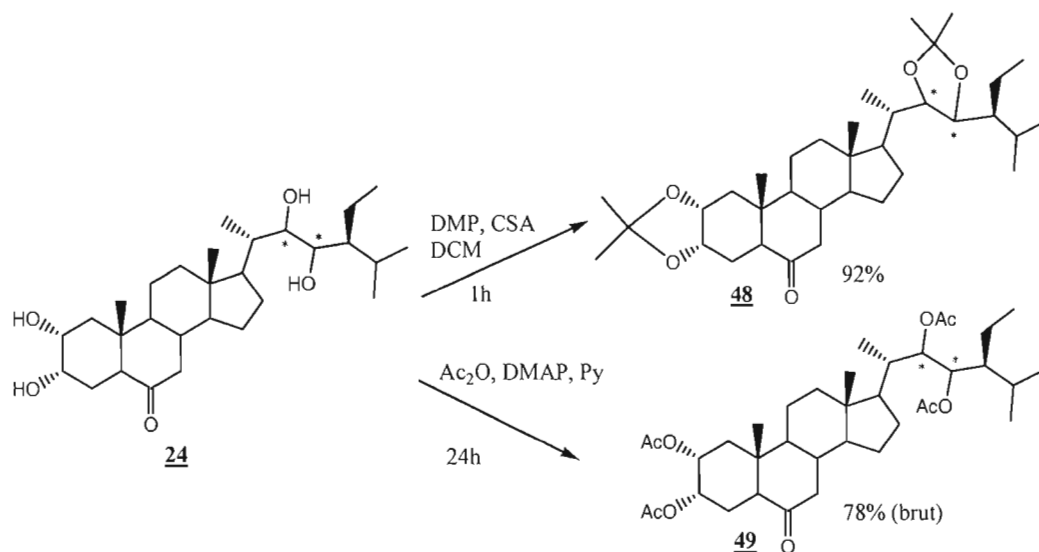
C'est ainsi que nous avons donc acheté chacun des constituants du mélange séparément et tenté la dihydroxylation en utilisant les conditions de Watanabe (0,2 éq de DHQ et 0,05 éq de  $\text{OsO}_4$ )<sup>(44)</sup>. Lorsque le diène **27** fut traité dans les conditions ci-dessous (figure 3.8), une disparition complète du produit de départ fut observé en CCM après 6 jours.



**Figure 3.8** Dihydroxylation asymétrique du diène **27** menant à la castastérone (**24a**) désiré et son isomère non désiré **24b**

Après purification nous avons été heureux d'observer que la 28-homocastastérone (**24**) était bien le produit de la réaction. Cependant même si le spectre RMN  $^1\text{H}$  correspondait parfaitement à celui de la littérature<sup>(31,32)</sup>, son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  lui nous réservait une surprise. En effet sur ce spectre on y voit le double des pics (et donc le double de carbones) que la molécule devrait avoir. Le produit obtenu est donc sous forme de mélange de diastéréoisomères. La comparaison des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  obtenus avec ceux de références<sup>(31,32)</sup> nous a permis de conclure que **24a** semble bien présent dans le mélange, mais son isomère **24b** 22 (S), 23 (S) semble l'être aussi (par erreur nous avons utilisés DHQ au lieu de DHQD (voir plus bas)). Nous avons vu que en C-2, C-3 on obtient majoritairement les OHs en  $\alpha$  sans l'utilisation de l'auxiliaire chiral. DHQ devrait donc encore plus forcer la mise en place de ces OHs en  $\alpha$ . De plus l'utilisation de DHQ est rapportée pour donner les OHs en C-2 et C-3 avec la stéréochimie (*R*), tel qu'indiqué plus bas même si ce résultat est surprenant. Notre spectre montre cependant le carbonyle de **24b** à 210 ppm ce qui ne devrait pas être le cas (plutôt 211 ppm selon McMorris<sup>(31,32)</sup>). Nous allons dans le futur poursuivre des études afin de prouver cette stéréochimie. Il nous a été impossible de quantifier ce ratio avec précision étant donné qu'en RMN  $^1\text{H}$  tous les signaux des 2 isomères sont parfaitement superposés. De la même façon il a été tout aussi impossible de les séparer à petite échelle avec un CPG-SM. Cependant, en RMN  $^{13}\text{C}$ , les signaux sont à peu près de la même intensité et étant donné que les molécules sont quasi identiques (à l'exception de la stéréochimie des OHs sur la chaîne), on peut supposer que le ratio est d'environ 1 : 1. Aussi les deux isomères ne donnent qu'une seule tache en CCM dans tous les mélanges d'éluants étudiés : hexane / acétone, benzène / acétate d'éthyle, chloroforme / éthanol, chloroforme méthanol, chloroforme / isopropanol, toluène / acétonitrile et cyclohexane / acétate d'éthyle. Bref, les deux produits sont inséparables par chromatographie éclair. Afin d'être en mesure de les séparer nous avons tenté de modifier les fonctions OHs en les transformant en des fonctionnalités plus encombrées et plus rigides en espérant que les nouveaux produits formés aient une affinité différente sur la silice. Nous avons donc tenté deux approches soit de former dans un premier temps le bis-acétonide **48** et ensuite de former le tétraacétate **49**

(figure 3.9). Dans les deux cas les réactions ont bien fonctionné, toutefois les produits demeurent toujours inséparables par chromatographie éclair. Ce résultat semble surprenant car McMorris<sup>(31)</sup> affirme que les deux isomères de **48** sont facilement séparables par chromatographie éclair. Toutefois nos difficultés de séparation sont en accord avec Mori et Takeuchi qui montrent que même dérivatisés leur séparation est très laborieuse, voire impossible<sup>(51)</sup>.

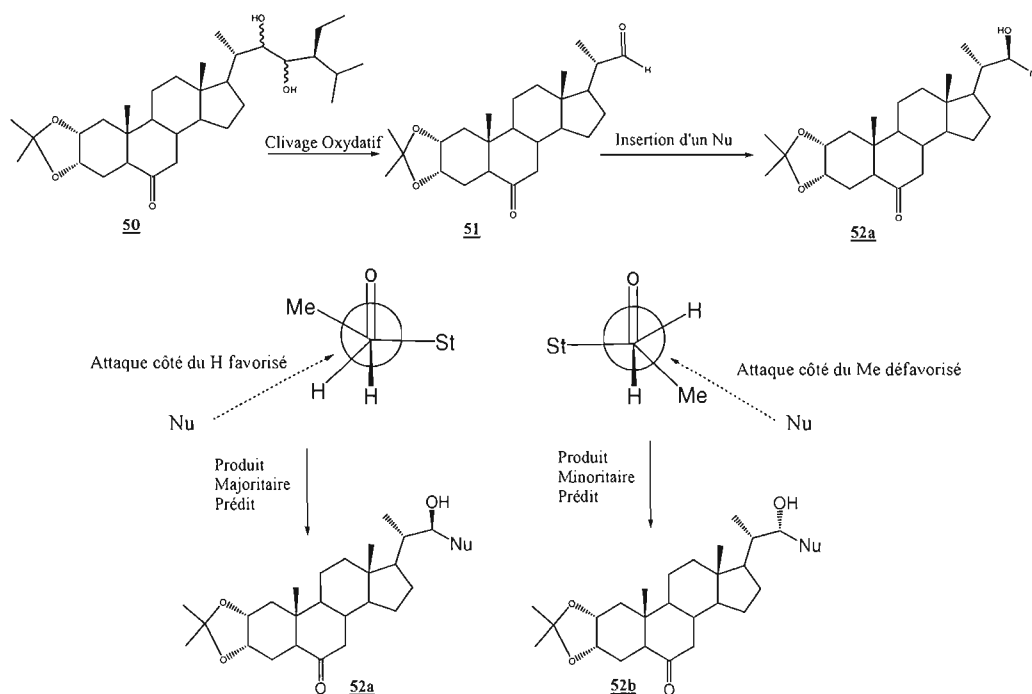


**Figure 3.9** Dérivatisation du mélange d'isomères de castastérone **24** en bis-acétonide **48** et en tétraacétate **49** pour tenter leur séparation

De plus, un fait intéressant est que nous avons au départ utilisé le DHQ au lieu du DHQD par inattention. En effet, pour obtenir les OHs **22** (*R*), **23** (*R*), l'auxiliaire chiral nécessaire est le DHQD. Or, même en changeant l'auxiliaire chiral on obtient toujours les mêmes deux produits dans les mêmes proportions (analyse RMN <sup>13</sup>C) ce qui ne devrait pas être le cas. Cependant, ce résultat n'est pas sans précédent, certains auteurs ont eux aussi observés cette anomalie<sup>(52,53)</sup>. À noter que dans la réaction impliquant le DHQD, le produit final est très difficile à obtenir car nous avons isolé majoritairement son ester osmique lié avec le DHQD. Une hydrolyse poussée nous a permis d'obtenir le même mélange qu'avec le DHQ. Nous ne pouvons encore expliquer ce phénomène. Nous faisons donc face à une impasse, l'impossibilité de

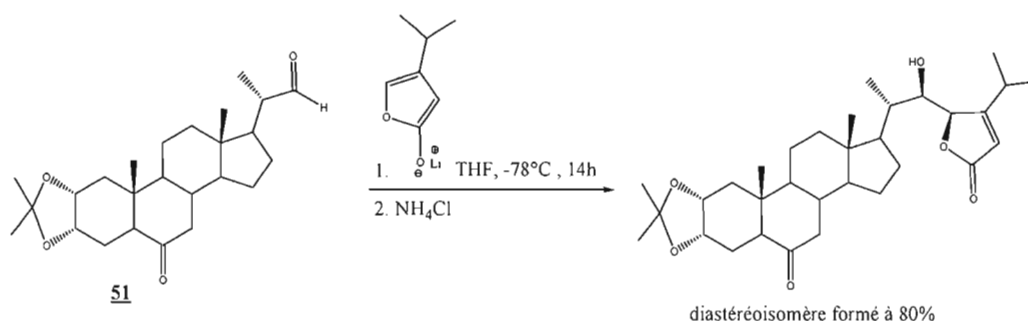


séparer le mélange nous empêchait en plus de réaliser l'oxydation de Baeyer-Villiger de façon à générer le brassinolide désiré. En effet, un test rapide de la réaction nous a montré qu'un mélange complexe des deux régioisomères de chacun des deux diastéréoisomères se formait. Il fallait donc trouver un moyen d'obtenir majoritairement la 28-homocastastérone (**24a**) avant de tenter la lactonisation. Idéalement on souhaite obtenir soit une méthode permettant d'obtenir majoritairement le produit désiré ou soit une méthode nous permettant une séparation des isomères formés. Notre meilleure idée fut de tenter l'insertion d'un nucléophile sur l'aldéhyde **51** qui serait générée par clivage oxydatif de **50** que nous avons pratiquement déjà préparé (on se rappellera que nous avons déjà préparé le bis acétonide **48**). Dans un tel cas où l'aldéhyde est chiral on devrait observer une sélectivité tel que prédit par le modèle de Felkin-Ahn<sup>(51)</sup> qui devrait favoriser la formation de **52a**, où la stéréochimie du C-22 est la bonne (*R*) (figure 3.10).



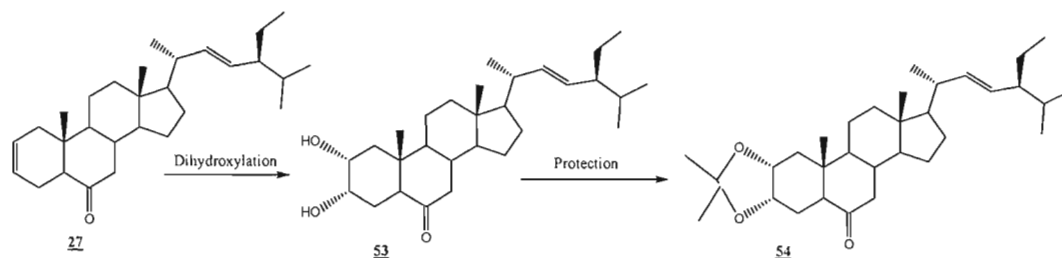
**Figure 3.10** Attaque régiosélective d'un nucléophile sur l'aldéhyde **50** contrôlé par le modèle de Felkin-Ahn

McMorris a déjà montré que dans ces conditions il est possible d'insérer un isobuténolide par condensation aldolique avec une excellente sélectivité<sup>(32)</sup> (figure 3.11). Le seul point faible est le nombre impressionnant d'étapes requises pour hydrolyser ce buténolide et générer le *cis* diol désiré (8 étapes en plus de la formation de **51**). Un balayage des conditions expérimentales devrait nous permettre d'obtenir le produit désiré avec la stéréochimie requise. Notons aussi que cette stratégie ouvre certaines portes dans la synthèse d'une grande quantité de brassinostéroïdes. Nous avons vu au chapitre 1 que les différences entre les membres de cette famille se font surtout sentir sur la chaîne alkyle en C-17, or selon la nature du nucléophile utilisé on pourrait possiblement obtenir la chaîne alkyle désiré.



**Figure 3.11** Insertion régiosélective d'un isobuténolide sur l'aldéhyde **52** selon McMorris

À noter que nous devons préparer **50** dont les alcools du cycle A sont protégés sous forme d'acétonide. La raison de cette protection vient du fait que le clivage oxydatif se réalise avec de l'acide périodique ( $\text{HIO}_4$ ) qui risquerait de suroxyder ou de dénaturer ces alcools. Or, nous avons déjà montré que la formation d'acétonides à partir de **24** n'est pas régiosélective, en 1h les 4 hydroxyles sont protégés. Ainsi, nous devons d'abord préparer le diol **53** que nous protégerons ensuite en acétonide **54** que nous pourrions ensuite dihydroxyler (figure 3.12).



**Figure 3.12** Plan pour la préparation du diol protégé **54**

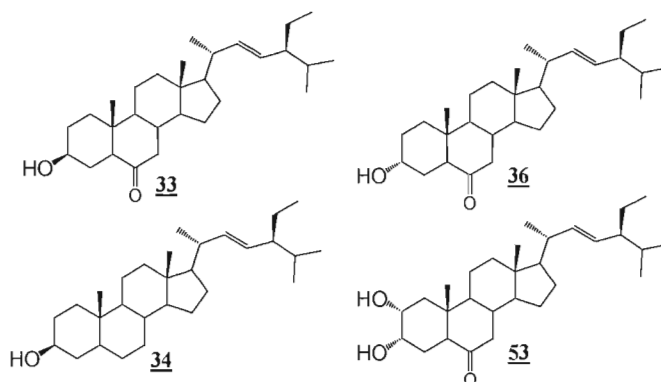
Le chapitre suivant traitera de la synthèse de **54** ainsi que ses différents analogues. Il est bon de se rappeler que nous voulions préparer différents dérivés naturels et synthétiques afin d'élaborer un modèle RSA de leur possible effet neuroprotecteur. Ainsi, dans le prochain chapitre, nous verrons comment nous avons préparé les différents précurseurs **33**, **34**, **36** et **54** et nous poursuivrons ensuite sur le résultat des oxydations sur ces dérivés.

## CHAPITRE IV

### SYNTHÈSE DE PRÉCURSEURS DE BRASSINOSTÉROÏDES

#### 4.1 Introduction

Comme nous l'avons constaté au chapitre précédant, nous avons été en mesure d'obtenir la 28-homocastastérone (**24a**). Cependant, celle-ci se retrouve sous forme d'un mélange avec son diastéréoisomère non désiré 22 (S), 23 (S) **24b**. Étant donné les difficultés que nous avons rencontrées pour les séparer, nous avons décidé de mettre au point un nouveau plan de synthèse. Tel qu'expliqué à la section précédente, la stratégie est basée sur le clivage oxydatif du diol en position C-22,C-23 de manière à obtenir un aldéhyde. Cet aldéhyde devrait nous permettre d'obtenir tous les motifs possibles que l'on retrouve dans nos molécules cibles (chapitre 2). Dans ce chapitre nous avons regroupé la préparation des précurseurs «alcènes» (tout juste au stade avant la dihydroxylation de ce lien 22,23). Plus précisément, nous aborderons la synthèse des molécules **33**, **34**, **36** et **53** (figure 4.1).

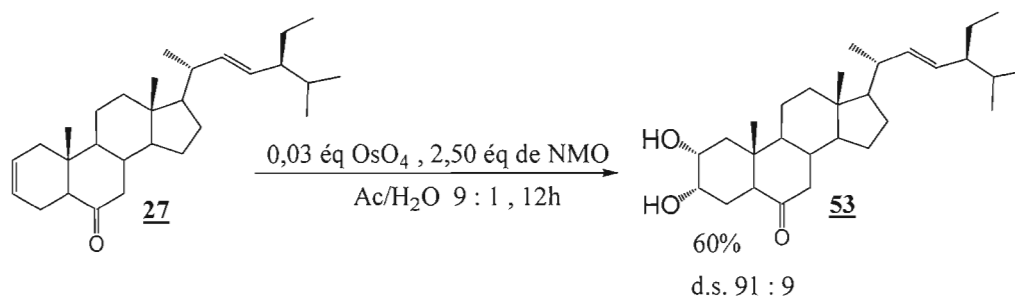


**Figure 4.1** Synthèses des molécules abordées au chapitre 4

## 4.2 Synthèse du diol 53 et de l'acétonide 54

Nous avons vu à la section 3.5 que lorsque le diène 27 est traité avec du tétraoxyde d'osmium (dans les conditions de Sharpless), on réussit à obtenir au bout de 6 jours la 28-homocastastérone. Ce produit est le résultat d'une double dihydroxylation sur les liens alcéniques en positions C-2, C-3 et en positions C-22, C-23. Or, ces insaturations sont dans des environnements chimiques très différents. L'une est dans un cycle à 6 et l'autre est sur la chaîne alkyle encombrée par le système stéroïdien. Il serait donc logique de croire que la réactivité de chacun de ces deux liens soit très différente. D'ailleurs, lorsque l'on suit la double dihydroxylation de 27 par CCM, on remarque que dès le premier jour tout le produit de départ est consommé pour donner en grande partie un seul produit un peu moins polaire que la 28-homocastastérone. Ce produit est bel et bien le diol 53 tel que confirmé par l'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit. Ainsi, même si la double hydroxylation nécessite 6 jours de réactions, la dihydroxylation du lien en C-22, C-23, elle, ne requiert que très peu de temps (12h). Il est d'ailleurs rapporté que les alcènes très encombrés réagissent plus lentement que les alcènes peu encombrés<sup>(43)</sup>. Il devrait être alors facilement possible d'obtenir 53 en optimisant les conditions réactionnelles pour empêcher la formation du produit de double dihydroxylation. Afin de minimiser

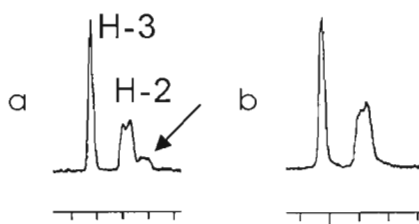
la formation du mélange de tétraol **24** (28-homocastastérone) et favoriser la formation du diol désiré lors de la dihydroxylation, nous avons modifié deux facteurs par rapport à la double dihydroxylation. Premièrement, nous avons diminué de beaucoup le temps de la réaction pour éviter l'oxydation du lien C-22, C-23 tel que décrit ci-haut. Deuxièmement, nous avons volontairement omis d'ajouter l'auxiliaire chiral dans le milieu réactionnel. On se rappellera qu'à la section 3.5 nous avons montré que l'auxiliaire chiral active l'osmium ce qui pourrait donc augmenter sa réactivité face au lien double C-22,C-23 ce que nous essayons d'éviter. Notons aussi que l'auxiliaire chiral n'est pas requis pour obtenir la bonne stéréochimie pour les alcools du diol **53**. Nous avons vu à la section 2.4 que l'osmium devrait attaquer par la face du dessous de la molécule (dans des conditions cinétiques) étant donné que le méthyle en C-10 bloque la face du dessus de la molécule. C'est avec ces précautions en tête que nous avons lancé la réaction dans des conditions classiques en utilisant le NMO comme cooxydant (figure 4.2). En suivant la réaction par CCM on s'est rendu compte que la dihydroxylation simple du lien C-2, C-3 ne requiert en moyenne que 12h pour arriver à complétion.



**Figure 4.2** Dihydroxylation stéréo et régiosélective du diène **27** en diol **53**

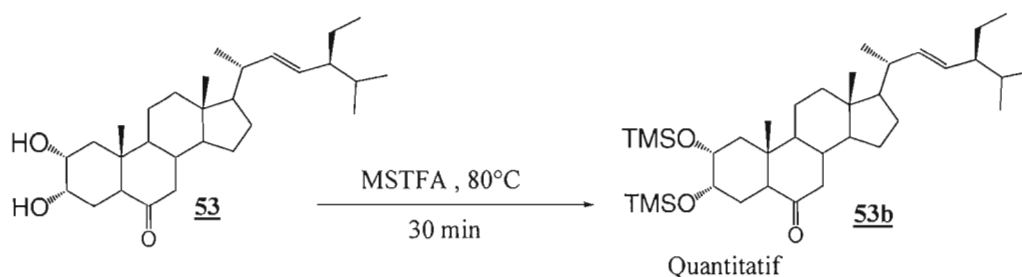
On remarque que le rendement global en diol est de 60%. Toutefois, le spectre RMN  $^1\text{H}$  semble laisser croire que nous avons un mélange de produit (cependant on observe une seule tache en CCM). La figure 4.3a montre la section du spectre RMN  $^1\text{H}$  entre 3,4 et 4,2 ppm (la région des hydrogènes sur les carbones porteurs des OH, en position C-2 et C-3) de **53** après chromatographie éclair. On remarque un tout

petit pic près du multiplet à 3,5 ppm (indiqué par la flèche). Ceci nous a laissé croire que ce faible signal à 3,5 ppm pourrait être dû à la présence de l'isomère 2 $\beta$ ,3 $\beta$  du diol dans le produit obtenu étant donné qu'aucun autre alcool cyclique n'est présent dans le mélange réactionnel.



**Figure 4.3** Section entre 3,6 et 4,2 ppm du RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de **53** avant (a) et après (b) recristallisation

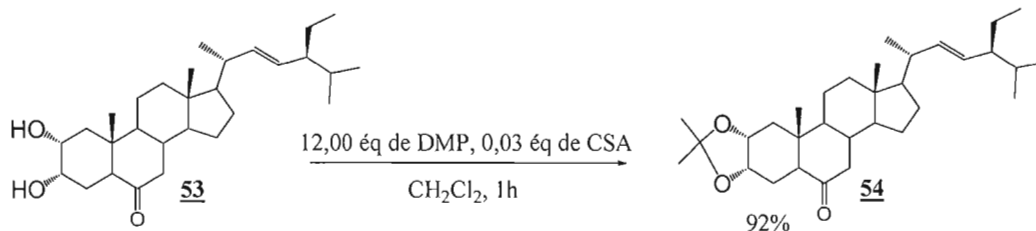
Pour prouver cette hypothèse nous avons tenté d'injecter directement **53** dans un CPG-SM. Cependant, notre CPG-SM (injection thermique) n'était pas en mesure de volatiliser **53**. C'est ainsi que nous avons dû procéder à la dérivation de **53** en son dérivé OTMS **53b**, selon une procédure connue<sup>(55)</sup>, pour réussir à le volatiliser. Lorsque le diol **53** est traité avec le N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA) à 80°C pendant 30 min, on observe sa conversion totale en son dérivé bis-triméthylsilyl **53b** (figure 4.4).



**Figure 4.4** Dérivation du diol **53** en dérivé OTMS **53b**

Ainsi, **53b** s'est avéré volatilisable au CPG-SM. L'analyse rigoureuse du chromatogramme et des spectres de masses obtenus nous a permis de conclure que la réaction a bel et bien donné un mélange de diastéréoisomères (2 produits

avec un ion moléculaire de même masse et avec des spectres de masses pratiquement identiques). Plus précisément, l'intégration des pics nous indique que le ratio est de 91 : 9 en faveur de l'isomère 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  désiré. Encore une fois, l'assignation de la stéréochimie a été faite par comparaison avec les références (voir section 3.5) et par la règle de Karplus (section 4.3). Cette assignation est simple car comme on le voit à la figure 4.3, le proton en C-2 ne sort pas au même endroit en RMN  $^1\text{H}$  selon sa stéréochimie. Même si le mélange était inséparable par chromatographie éclair, nous avons éventuellement réussi à purifier l'isomère désiré en recristallisant le mélange de diol dans l'éthanol absolu. La figure 4.3b permet d'apprécier la disparition du multiplet de l'isomère non désiré. La recristallisation peut cependant s'avérer problématique car nous avons eu recours à plusieurs recristallisations successives afin d'obtenir un produit pur. La technique permet néanmoins d'obtenir le produit requis pour les étapes suivantes. Notons aussi que jusqu'à présent nous n'avons pas été en mesure de réaliser la réaction et la purification à grande échelle (pas plus de 200-300 mg). Une fois le diol **53** pur obtenu, nous avons procédé à sa protection sous forme d'acétonide. On se rappellera que cette protection est nécessaire car nous allons réaliser un clivage oxydatif plus tard dans notre synthèse. La transformation est simple et rapide et fournit un bon rendement (figure 4.5). Il ne suffit que de faire réagir **53** avec le 2,2-diméthoxypropane (DMP) en présence d'un catalyseur acide (nous avons utilisé l'acide camphorsulfonique) pendant une heure pour obtenir **54** avec un rendement purifié de 92%. Nous verrons les résultats de l'oxydation de **54** au chapitre 5.

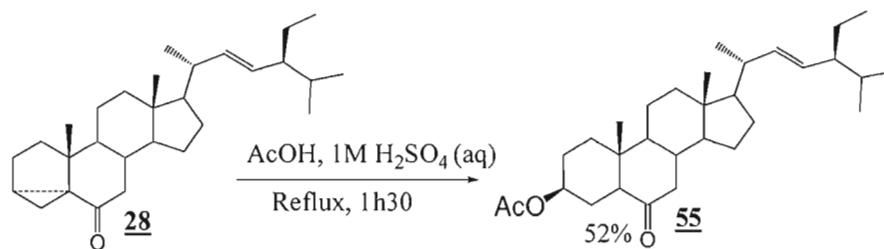


**Figure 4.5** Protection du diol **53** sous forme d'acétonide **54**



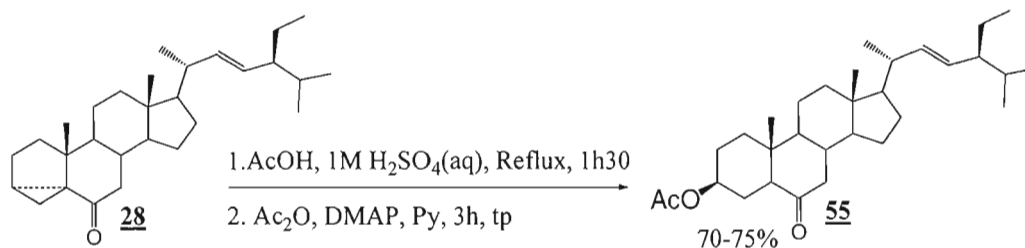
### 4.3 Synthèse du précurseur de la 28-homotéastérone (**25**)

La 28-homotéastérone (**25**) constitue elle aussi une de nos molécules cibles. Celle-ci a la particularité structurale de posséder une seule fonction alcool en position C-3. De plus, cet alcool se retrouve en  $\beta$  sur le cycle stéroïde ce qui fait contraste avec le *cis* diol en  $\alpha,\alpha$  de la 28-homocastastérone (**24a**). Au chapitre 2 nous avons vu que notre plan consiste en l'insertion d'un nucléophile oxygéné sur la cétone pentacyclique **28**. Aussi, au chapitre 3, nous avons montré que l'on peut procéder à l'insertion de nucléophile (un Br) sous catalyse acide sur cette même cétone **28**. Ainsi, pour réaliser cette transformation, il faut trouver un équivalent nucléophile et masqué de la fonction OH. La raison tient principalement du fait que la réaction nécessite une catalyse acide et de chauffer à reflux (voir l'addition élimination section 3.4). On peut alors comprendre que l'eau (si on y réussit à dissoudre le stéroïde) serait un très mauvais nucléophile dans ces conditions car la présence d'acide limiterait son pouvoir nucléophile. De plus, en présence d'acide on pourrait risquer de protonner le OH une fois celui-ci additionné pour ensuite mener à son élimination à cause de l'énergie apportée par le reflux. L'utilisation de OH<sup>-</sup> directement ne serait pas non plus souhaitable étant donné que l'on aurait une compétition entre l'insertion en C-3 désirée et l'élimination en C-2 et C-4 qui conduirait à un mélange de diène. Idéalement on souhaiterait aussi que l'équivalent masqué de OH utilisé soit facilement déprotégé avec un rendement élevé. Le meilleur nucléophile que l'on a trouvé pour cette fonction est un groupement acétate. D'une part l'hydrolyse d'un acétate est une réaction classique et simple de chimie organique. D'autre part, l'insertion d'un acétate nous permet d'utiliser l'acide acétique à la fois comme nucléophile, comme solvant et comme catalyseur acide ce qui simplifie beaucoup la réaction. Afin de mener la réaction à terme, nous avons ajouté au milieu réactionnel un peu d'acide sulfurique 1M aqueux. Cette solution acide aqueuse permet de favoriser la protonation du C=O en position 6 (l'acide sulfurique étant un meilleur acide que l'acide acétique<sup>(56)</sup>). Nous avons donc lancé la réaction dans les conditions ci-dessous (figure 4.6) et avons observé la formation du produit désiré avec un rendement de 52%.



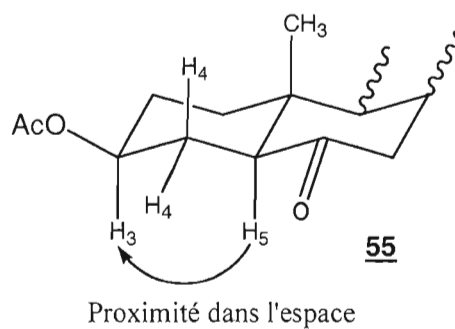
**Figure 4.6** Insertion d'un acétate en position C-3 sur la cétone **28**

Évidemment, nous avons été un peu déçu par le rendement obtenu. En faisant minutieusement la chromatographie sur colonne de **55**, nous nous sommes rendu compte que la réaction avait aussi produit directement le 3-OH désiré avec un rendement de 20% par déprotection in situ de l'acétate. Cette déprotection est sûrement le fruit des conditions acides sévères et du reflux utilisé lors de la réaction. Il serait donc difficile d'éliminer cette hydrolyse. De plus, même si on obtient le 3-OH désiré directement comme produit secondaire, leur séparation est laborieuse par chromatographie éclair et nécessite d'utiliser deux système d'éluant différents (le 3-OH étant beaucoup plus retenu par la silice et nécessite un éluant beaucoup plus polaire). Aussi, l'acétate **55** pourrait être utile lors de la dihydroxylation du lien alcénique en C-22,C-23 (chapitre 5) étant donné que l'acétate pourrait agir comme groupement protecteur lors de l'oxydation. C'est pour cette raison que nous n'avons pas poussé l'hydrolyse à terme et plutôt tenté d'optimiser l'obtention de l'acétate **55**. Afin d'augmenter le coté pratique de la réaction nous avons ajouté une séquence de reprotection à la réaction. Ainsi, une fois l'acétate **55** brut obtenu (contenant un peu de l'alcool **33**), nous dissolvons directement celui-ci dans la pyridine et procédons à l'acétylation du mélange avec l'anhydride acétique et la diméthylaminopyridine (DMAP) (figure 4.7). Le rendement global obtenu passe alors à 70-75% ce qui est beaucoup plus intéressant que le 52% du premier essai réalisé.



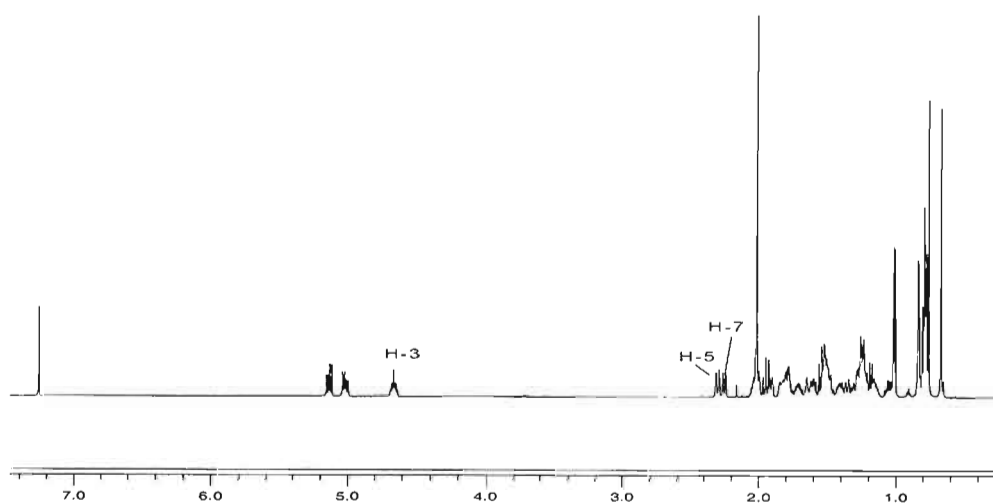
**Figure 4.7** Séquence réactionnelle optimisée pour la formation de l'acétate **55** à partir de la cétone **28**

Nous devons maintenant discuter de la stéréochimie obtenue pour **55**. On avait laissé entendre à la section 3.2 que notre hypothèse pour cette transformation est que l'attaque du nucléophile (l'acide acétique) se déroule à la manière d'une S<sub>N</sub>'. Le groupement partant étant ici les électrons du pont entre le C-3 et le C-5. Si tel est le cas, l'attaque devrait se dérouler de manière dorsale et donc par la face du dessus de la molécule (le pont étant par-dessous). La stéréochimie de **55** devrait ultimement prouver cette affirmation si l'acétate se trouve en β sur le stéroïde. Nous allons ici démontrer de deux façons que l'acétate **55** obtenu lors de l'insertion possède bel et bien la stéréochimie issue d'une attaque dorsale. Tout d'abord, nous avons effectué une expérience n.O.e afin de vérifier si l'hydrogène sur le carbone porteur de l'acétate est en corrélation à travers l'espace avec l'hydrogène de la jonction en C-5. La figure 4.8 montre clairement que même si un carbone sépare les deux hydrogènes, ils sont tout de même relativement près dans l'espace. Ainsi, selon cette figure, si l'acétate pointe véritablement par-dessus le plan, on devrait observer un effet n.O.e entre H-3 et H-5.



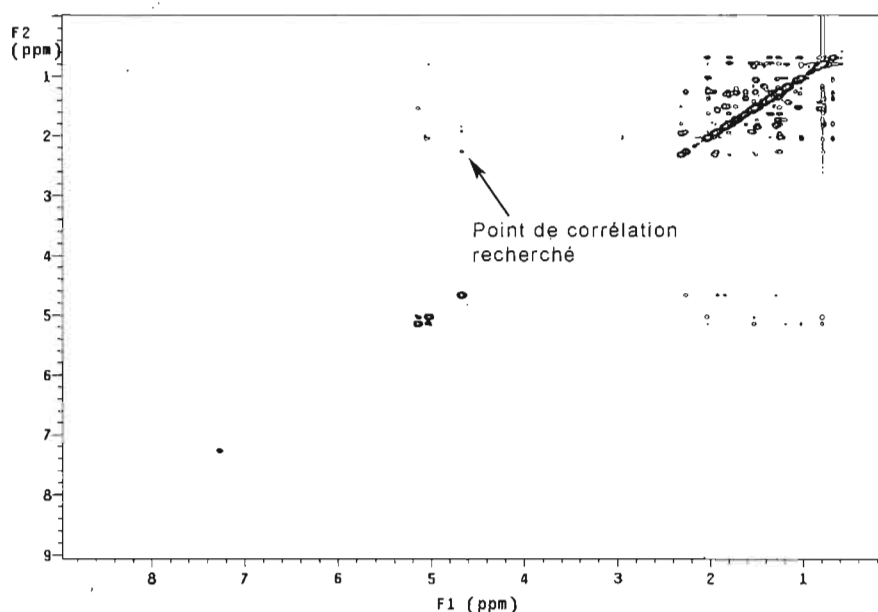
**Figure 4.8** Proximité spatiale entre H-3 et H-5 chez l'acétate **55**

La figure suivante (figure 4.9) montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  à 600 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  de **55**. Nos études du spectre de **55** nous a permis de conclure que H-3 correspond au multiplet à 4,60 ppm et que H-5 correspond au doublet de doublet à 2,31 ppm. Notons aussi que sur le spectre on semble observer un doublet de doublet à 2,27 ppm mais les agrandissements montrent bien que ce sont deux doublets de doublets (soit un pour H-5 et un pour H-7).



**Figure 4.9** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de **55** à 600 MHz dans  $\text{CDCl}_3$

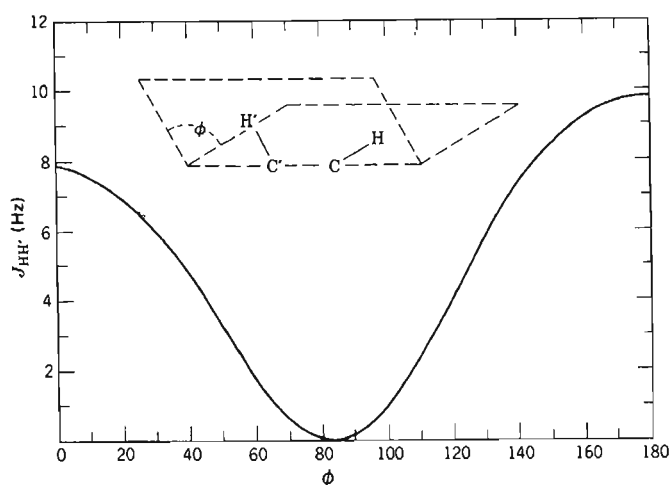
Nous avons ensuite enregistré le spectre RMN NOESY de **55** (figure 4.10). Si vraiment l'acétate est en  $\beta$ , on devrait voir un point de corrélation entre le signal proton à 2,31 ppm et celui à 4,60 ppm. Sur ce spectre on remarque bel et bien un point de corrélation à cet endroit quoi que relativement faible. On a donc un premier indice nous permettant de croire que l'on a bel et bien le bon produit. De plus, il est bon de mentionner que même si le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre qu'il y a deux doublets de doublets très près l'un de l'autre à 2,20 ppm (l'un à 2,31 et l'autre à 2,27 ppm), seulement le doublet de doublet de H-5 peut montrer une corrélation logique avec H-3. En effet, le doublet de doublet le plus blindé correspond en fait à un hydrogène en C-7. Il est donc impossible de voir une corrélation avec H-3 à si longue distance ( $J^6$ ). Ceci dissipe donc ce doute à savoir à quel doublet de doublet correspond le point de corrélation.



**Figure 4.10** Spectre NMR NOESY de **55** à 600 MHz dans  $\text{CDCl}_3$

Même si le NOESY est une preuve assez forte prouvant la stéréochimie de **55**, il est aussi possible d'appliquer la règle de Karplus<sup>(46)</sup>, afin de prouver la position de l'acétate. Cette règle s'applique dans les systèmes cycliques figés à 6 carbones,

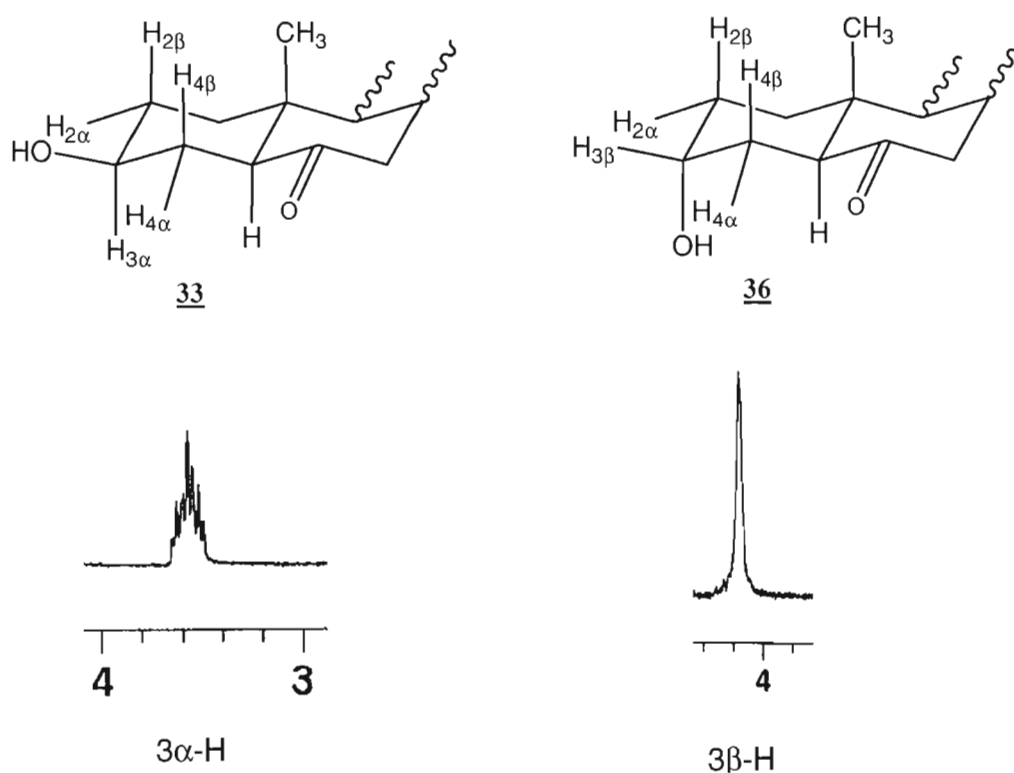
c'est-à-dire les systèmes cycliques où il ne peut y avoir interconversion d'une forme chaise à un autre. Dans nos brassinostéroïdes et leurs précurseurs, cette règle s'applique car chacun des cycles à 6 sont liés entre eux ce qui empêchent leur interconversion. Ce que Karplus a montré est que la constante de couplage vicinal entre deux hydrogènes est fonction de l'angle dièdre entre les deux protons couplés dans ce type de système. La figure 4.11 tirée du volume de Silverstein<sup>(57)</sup> permet rapidement de comprendre l'intérêt dans l'assignation de la stéréochimie de **55**.



**Figure 4.11** Règle de Karplus : effet de l'angle dièdre sur la constante de couplage vicinale dans un système cyclique figé

Ainsi, lorsque l'angle dièdre est de  $180^\circ$  on obtient une constante de couplage élevée alors que lorsque l'angle est près de  $90^\circ$ , elle est nulle. Ceci a donc comme conséquence que le couplage entre deux hydrogènes axiaux (à  $180^\circ$ ) sera nécessairement plus fort que le couplage entre un hydrogène axial et un hydrogène équatorial ( $60^\circ$ ) et plus fort qu'un couplage entre deux hydrogènes équatoriaux ( $60^\circ$ ). La valeur de la constante de couplage devrait donc nous permettre de confirmer la stéréochimie de **55**. Afin que l'analyse soit plus intéressante nous devons comparer la constante de couplage de H-3 des 2 épimères pour pouvoir

véritablement apprécier la différence entre les deux signaux. Nous n'avons malheureusement pas préparé l'épimère 3-OAc  $\alpha$  de **55**. Toutefois, nous avons bel et bien préparé les deux isomères des deux molécules avec la fonction OH en C-3 (l'hydrolyse de l'acétate **55** en alcool **33** sera abordée plus loin dans cette section alors que l'inversion de cet alcool sera décrite à la section 4.4) ce qui nous permet d'effectuer la comparaison. La figure 4.12 montre le signal RMN  $^1\text{H}$  du proton sur le carbone lié à l'alcool pour les deux épimères synthétisés.



**Figure 4.12** Signaux RMN  $^1\text{H}$  à 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) engendrés par chacun des hydrogènes en position C-3 des deux épimères **33** et **36**

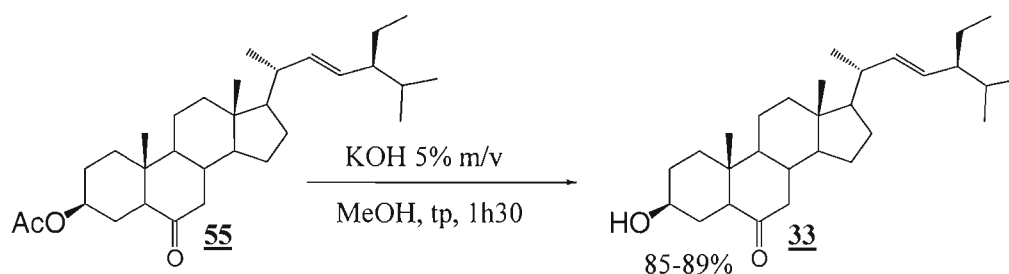
On remarque tout d'abord que l'apparence du signal de l'alcool **33** est identique à celui de l'acétate **55** (multiplet à 4,6 ppm figure 4.9). C'est tout à fait normal car **33** est le produit d'hydrolyse de **55** et la stéréochimie n'a pas été modifiée durant l'hydrolyse (c'est ce qui rend la comparaison valable). Aussi l'acétate ne possède

pas d'hydrogène qui peuvent être couplés avec H-3 ce qui implique que la constante de couplage ne devrait pas être fortement affectée par l'hydrolyse. Ensuite on remarque que le signal du H-3 est bien différent pour chacun des deux épimères en plus de ne pas posséder le même déplacement chimique. Dans le cas de **33** on a un multiplet complexe et dans le cas de **36** on a un multiplet qui à l'allure d'un singulet élargi. Même s'il est impossible de mesurer directement la constante de couplage de ces multiplets, il est tout de même possible d'en faire une analyse qualitative avec la règle de Karplus. Dans le cas de **33**, l'hydrogène en H<sub>3α</sub> est en position axiale ce qui implique qu'il sera fortement couplé avec H<sub>4β</sub> et H<sub>2β</sub> (couplage à 180°) et faiblement couplé avec H<sub>4α</sub> et H<sub>2α</sub> (couplage à 60°) selon notre discussion plus haut. Or, dans le cas de **36**, l'hydrogène en H<sub>3β</sub> est en position équatoriale et ne pourrait qu'être faiblement couplé avec les protons H<sub>4β</sub>, H<sub>2β</sub>, H<sub>4α</sub> et H<sub>2α</sub> (couplage à 60°). Ainsi, dans le cas de **36**, les constantes de couplages étant relativement faibles, le dédoublement du signal est faible et les pics se recouvrent pour donner un singulet élargi. Pour **33**, le couplage transoïde initial fort fait que les pics sont un peu plus éloignés et on réussit à voir tout de même certains pics du multiplet causé par les constantes de couplages plus faibles. De plus, notons aussi qu'il est simple à voir qu'avec l'échelle sous les signaux (figure 4.12) que le singulet de **36** est étendu sur une plus petite plage en Hz que le multiplet complexe de **33** ce qui implique que les constantes de couplages du multiplet de **36** sont plus faibles que chez **33**. Ainsi, la règle de Karplus et le RMN <sup>1</sup>H NOESY nous permettent hors de tout doute d'affirmer que l'acétate de **55** est véritablement en position β ce qui concorde avec une attaque dorsale de type Sn'. Ajoutons finalement que nous avons été en mesure de préparer **55** et de le purifier à grande échelle (quelques grammes), ce qui en fait une réaction très utile dans nos synthèses.

Une fois l'acétate **55** obtenu, on peut maintenant procéder à son hydrolyse afin d'obtenir notre précurseur **33**. À noter que l'acétate **55** peut aussi nous être utile lors de l'oxydation du lien C-22, C-23 que l'on veut réaliser. En effet celui-ci peut agir comme groupement protecteur de la fonction alcool, et comme pour l'acétonide **54**



nous verrons le résultat de l'oxydation au chapitre 5. Quoi qu'il en soit, **33** nous est utile d'une part pour nos tests biologiques que l'on veut effectuer (rappel : un de nos objectif secondaire est de cibler quelles fonctions sont responsables de l'effet neuroprotecteur) et d'autre part nous permettra d'essayer d'autres groupements protecteur pour l'oxydation si l'acétate n'est pas compatible avec la méthode d'oxydation choisie. L'hydrolyse de **55** réalisée ici est triviale et utilise la réaction classique avec l'hydroxyde de potassium à 5% m/v dans le méthanol à température pièce (figure 4.13).



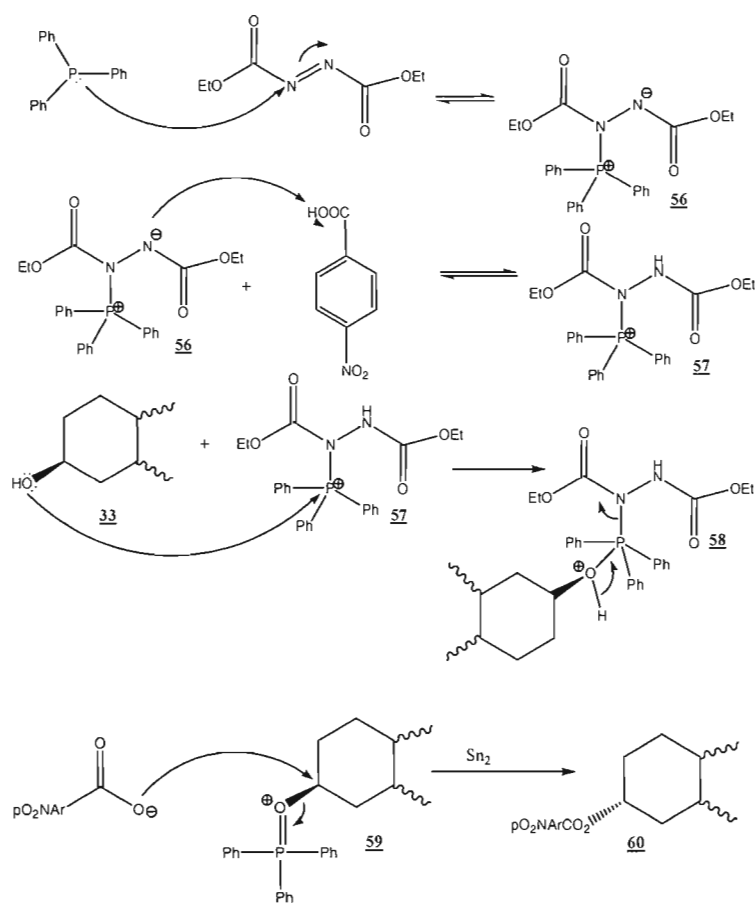
**Figure 4.13** Hydrolyse de l'acétate **55** en alcool **33**

Après 1h30 de réaction à température pièce et après purification par chromatographie sur colonne, on obtient l'alcool **33** avec un excellent rendement (85-89%).

#### 4.4 Inversion de l'alcool **33** en l'alcool **36**

Afin d'obtenir plus de données pour établir notre modèle RSA de l'activité biologique de nos molécules, nous avons pensé préparer plusieurs dérivés non naturels avec des configurations différentes des centres chiraux alcooliques (chapitre 2). Étant donné que nous sommes en mesure de préparer facilement et en grande quantité **33**, nous avons tenté de préparer l'épimère de **33**, qui est en tout point identique mise à part la configuration inverse de son alcool en C-3. Encore une fois il est bon de rappeler que nous pourrions obtenir un brassinotéroïde synthétique une fois que nous serons en mesure de réaliser notre clivage oxydatif. Ainsi chacun des

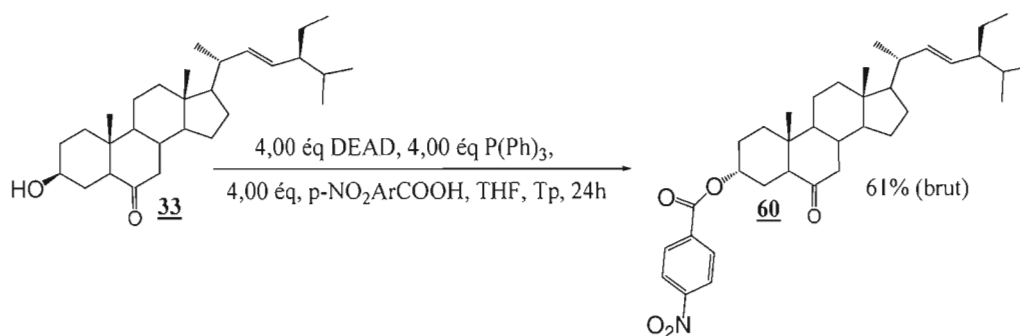
fragments que l'on prépare pourra ultimement nous être utile dans nos plans de synthèses globaux. Pour réaliser cette inversion, nous avons évidemment songé à la réaction de Mitsunobu<sup>(37)</sup> en utilisant la méthode améliorée par Martin<sup>(58)</sup> qui utilise l'acide p-nitrobenzoïque comme nucléophile. La réaction met en jeu notre alcool **33**, de la triphénylphosphine, de l'acide p-nitrobenzoïque et le azodicarboxylate de diéthyle (DEAD). Le mécanisme de la réaction illustré ci-dessous aide à comprendre pourquoi la réaction mène à la formation d'un p-nitroester avec inversion de configuration (**Schéma 2**).



**Schéma 2**

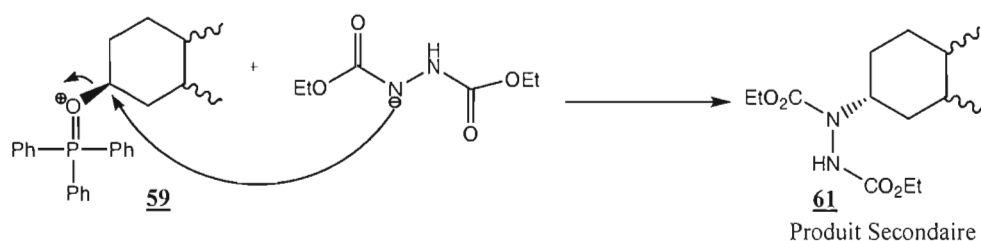
Ainsi, la triphénylphosphine qui possède une paire d'électrons libre, joue le rôle d'un nucléophile et vient attaquer le DEAD. Cette attaque conduit à la formation d'un ion phosphonium **56** dans le milieu réactionnel qui une fois protonné en **57** est

rapidement piégé par notre alcool stéroïdien **33**. Le réarrangement de cet intermédiaire **58** mène à la formation d'un intermédiaire **59** avec un lien O=P fort où l'oxygène de ce lien est chargé positivement. Ceci en fait donc un excellent groupement partant car sa substitution mène à l'expulsion de l'oxyde de triphénylphosphine possédant un lien fort P=O. Il a été démontré par Mitsunobu<sup>(37)</sup> que cette substitution se fait selon un mécanisme S<sub>N</sub>2. Ainsi, l'anion de l'acide p-nitrobenzoïque procède à l'attaque de manière dorsale (par la face  $\alpha$ ) sur l'intermédiaire **59**, ce qui conduit ultimement au p-nitroester **60** avec inversion de configuration. C'est ainsi que nous avons traité l'alcool **33**, dans les conditions de la réaction de Mitsunobu modifiée par Martin<sup>(58)</sup> dans l'espoir d'obtenir le p-nitroester **60** (figure 4.14).



**Figure 4.14** Formation du p-nitroester **60** à partir de l'alcool **33** par la réaction de Mitsunobu

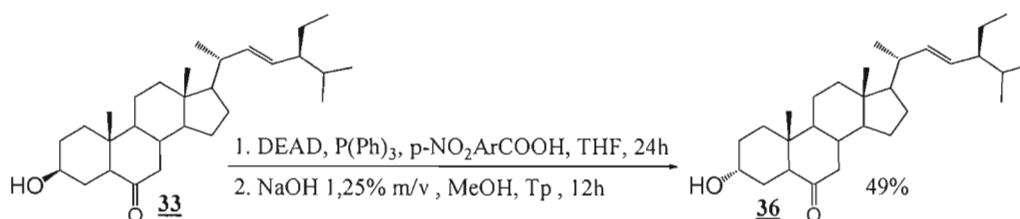
La réaction est relativement longue, nous l'avons suivie pendant 14h en CCM et il restait toujours du produit de départ. C'est pourquoi nous l'avons laissée pendant toute la nuit pour obtenir un temps de réaction d'environ 24h. De plus, le produit est très difficile à purifier par chromatographie éclair. En effet le produit secondaire **61** de la réaction, dont la formation est décrite à la figure 4.15<sup>(59)</sup>, élué en même temps que le produit désiré lors de la chromatographie.



**Figure 4.15** Formation du produit secondaire principal lors de la réaction de Mistunobu

Nous avons éventuellement trouvé que l'utilisation de  $\text{CHCl}_3$  comme éluant permet une bien meilleure séparation en jouant sur la solubilité du dérivé hydrazine non désiré pendant la chromatographie. Le produit obtenu contient néanmoins certaines impuretés qui nous ont été impossible d'éliminer par recristallisation (voir le RMN  $^1\text{H}$  de la partie expérimentale). C'est pour cette raison que nous avons décidé d'hydrolyser directement le mélange brut obtenu lors de la réaction de Mistunobu. En effet, notre hypothèse était que l'hydrolyse du p-nitroester devrait être plus facile que celle du produit secondaire (la fonction p-nitroaryle active le lien  $\text{C}=\text{O}$  de l'ester, alors que les azotes de la fonction hydrazine du produit secondaire stabilisent ses esters). Le fait que les esters sont plus facilement hydrolysés que les carbamates renforce aussi notre hypothèse<sup>(49)</sup>. Idéalement, dans les conditions optimales, seulement **60** devrait être hydrolysé. Cette différence de polarité entre **36** (le produit d'hydrolyse de **60**) et le produit secondaire **61** devrait nous permettre d'obtenir une meilleure séparation sur le gel de silice. Nos premiers essais ont consisté à réaliser l'hydrolyse du p-nitroester **60** dans les mêmes conditions que l'hydrolyse de l'acétate **55**, c'est-à-dire avec KOH 5% m/v dans le MeOH. Cependant, dans ces conditions, nous avons plutôt obtenu un mélange de produits d'élimination. La concentration de la base était trop forte et comme la fonction p-nitroester est un bon groupe partant, nous avons assisté à son élimination. Pour empêcher cette élimination parasite, nous avons plutôt remplacé le KOH par le NaOH et avons diminué sa concentration à 1,25 % m/v. Dans ces conditions la réaction est longue (12h vs 1h30 pour l'hydrolyse de l'acétate **55**) car le produit de départ est très peu soluble dans le

MeOH et en plus est consommé lentement par la base en quantité plus faible. Cependant la réaction fonctionne très bien et le produit est maintenant facilement purifié par chromatographie éclair. La séquence «formation du p-nitroester **60** - hydrolyse dans le MeOH avec NaOH» fournit le composé **36** avec un rendement global acceptable de 49% (deux étapes) (figure 4.16).



**Figure 4.16** Formation de l'épimère **36** par inversion de Mitsunobu sur **33**

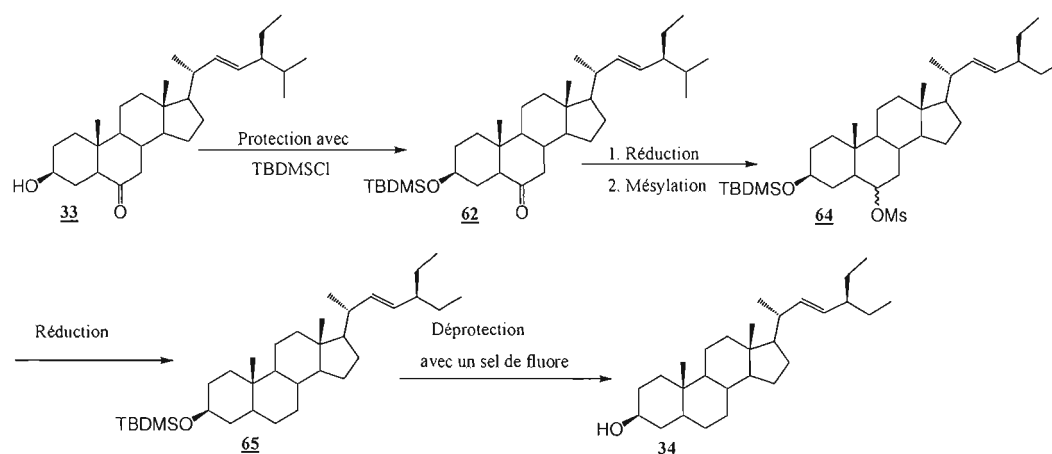
De plus, la réaction donne seulement le stéréoisomère désiré selon le RMN  $^1\text{H}$ . Nous avons vu à la section précédente que selon la stéréochimie de l'alcool, le déplacement chimique et l'apparence du multiplet en H-3 varie. Or, un seul multiplet est visible en RMN  $^1\text{H}$  et selon notre discussion sur la règle de Karplus, ce multiplet prouve hors de tout doute que l'alcool est en  $\alpha$ . À noter que lors des travaux futurs il pourrait être avantageux d'utiliser le diisopropylazodicarboxylate (DIAD) au lieu du DEAD car Meyers<sup>(60)</sup> a montré lors de ses travaux que l'hydrazine secondaire est souvent plus facilement séparée du produit désiré en utilisant le DIAD. Aucune justification n'est donnée à cet égard mais on peut penser que c'est peut-être dû à une interaction différente sur la silice causée par le groupement isopropyle plus volumineux.

#### 4.5 Réduction de la cétone **33** par substitution réductrice d'un mésylate

À la section 2.1 nous avons présenté les quatre molécules cibles que nous voulions préparer. Une de ces molécules, **26**, a la particularité de ne pas posséder de carbonyle en C-6 et de posséder la fonctionnalité *cis* diol  $\alpha,\alpha$  en C-2, C-3. Nous

avons déjà préparé **53** qui possède la fonctionnalité *cis* diol, mais qui possède aussi un carbonyle en C-6. Ainsi, la réduction de **53** devrait fournir le précurseur alcène de **26**. Cependant à la section 4.1 nous avons montré que nous ne sommes pas en mesure de préparer le diol **53** à grande échelle car le produit nécessite plusieurs purifications afin d'être stéréochimiquement pur. Afin de mettre la réaction au point, nous avons plutôt travaillé sur la réduction de l'alcool **33** que l'on peut facilement obtenir en 5 étapes à partir du stigmastérol (**32**) (section 4.3). Une fois la réaction réussie et optimisée sur **33** nous pourrions l'appliquer à **53**. De plus, les nouvelles molécules préparées suite à la réduction de **33** nous permettront aussi d'enrichir notre modèle RSA.

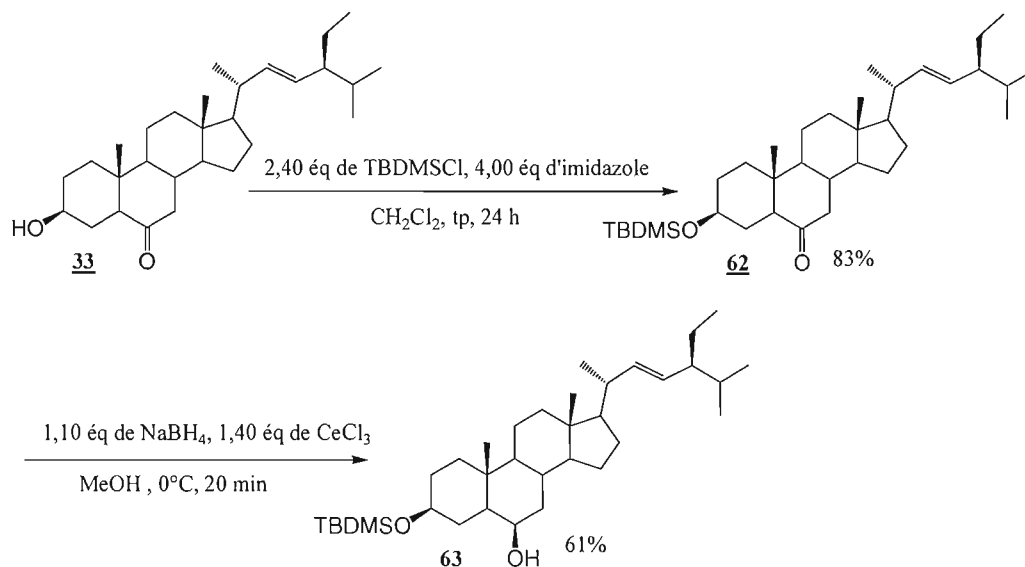
Afin de réaliser cette transformation, notre idée de départ consistait à réduire le carbonyle en C-6, procéder à sa méthylation puis à éliminer le méthyle par réduction. Une des raisons qui nous a poussé à étudier cette voie est la facilité de mise en œuvre et l'excellent rendement que nous avons eu pour la méthylation du stigmastérol (90-97%, section 3.1). Étant donné que le produit de réduction du C=O serait aussi un alcool secondaire stéroïdien, on pourrait alors s'attendre à obtenir un rendement similaire. Pour mener la réaction à terme nous nous devons de différencier l'alcool en C-3 de l'alcool en C-6 car la méthylation pourrait s'effectuer sur les deux alcools (et donc la réduction détruirait les 2 méthyles). De plus, l'alcool libre en C-3 pourrait venir réagir avec le réducteur ce qui nécessiterait l'utilisation inutile d'un excès de réactif. Il faut donc protéger l'alcool en C-3 avant de procéder à la réduction du carbonyle. Notre choix s'est arrêté sur le groupement protecteur TBDMS de Corey<sup>(61)</sup> qui devrait résister à l'agent réducteur. Une fois la réduction du méthyle terminée, nous pourrions facilement obtenir l'alcool sans carbonyle **34** en déprotégeant le groupement silylé avec un sel de fluorure. La figure 4.17 illustre notre idée globale de synthèse pour la préparation de **33**.



**Figure 4.17** Séquence réactionnelle envisagée pour la préparation de **34** à partir de **33**

Nous avons ainsi débuté la séquence en procédant à la protection de l'alcool **33** en son éther *t*-butyldiméthylsilylé **62** dans les conditions de Corey en utilisant le chlorure de *t*-butyldiméthylsilane (TBDMSCl) et l'imidazole dans le dichlorométhane. La réaction a fourni le composé silylé **62** avec un rendement purifié de 83%. La réduction subséquente de **62** avec NaBH<sub>4</sub> et le chlorure de cérium (III) selon la procédure de Luche<sup>(62)</sup> a fournit le C-6 alcool correspondant **63** avec un rendement purifié de 61% (figure 4.18). Jusqu'à ce stade, notre plan semblait donner les résultats escomptés. Nous devons maintenant procéder à la méthylation de **63** dans les mêmes conditions que nous avons utilisées à la section 3.1 lors de la synthèse de la 28-homocastastérone. Cependant, en mettant **63** en présence de triéthylamine et de chlorure de mésyle dans le toluène à 0°C, nous avons été surpris de ne constater aucune méthylation. En effet, il n'y avait aucun changement en CCM. Nous avons donc ramené le mélange réactionnel à température pièce dans l'espoir que la réaction s'y déroule mieux qu'à 0°C. Après une matinée de réaction, il restait encore beaucoup de produit de départ en CCM et un nouveau produit moins polaire était maintenant présent dans le milieu réactionnel. Cette observation était encourageante car nous avons observé au préalable que le mésylate de

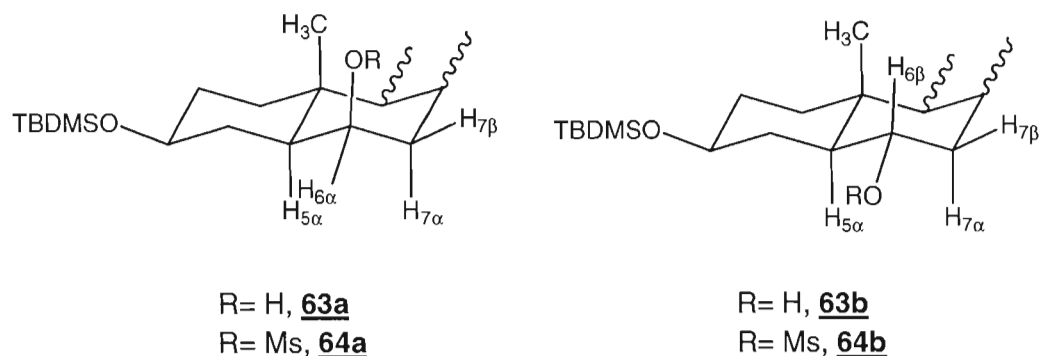
stigmasterol **47** était moins retenu sur la silice que le stigmasterol (**32**). Cependant la chromatographie sur colonne nous réservait une surprise de taille.



**Figure 4.18** Séquence réactionnelle utilisée pour la réduction de **33** menant à **34**

En effet le RMN  $^1\text{H}$  du produit isolé ne montrait pas la présence du mésylate désiré **64**, mais montrait plutôt la formation d'un nouveau lien alcénique. Nous avons rapidement compris qu'il y a avait eu une élimination pour conduire à la formation d'un lien  $\text{C}=\text{C}$ . Ceci implique donc que le mésylate s'est bien formé, mais qu'à température pièce celui-ci a rapidement été éliminé. Mais pourquoi, dans ce cas-ci, l'élimination est si favorisée. Nous croyons que tout ceci découle de la stéréochimie obtenue lors de la réduction de **62**. La figure 4.19 montre les deux stéréoisomères possibles de **63** que la réduction aurait pu engendrer.



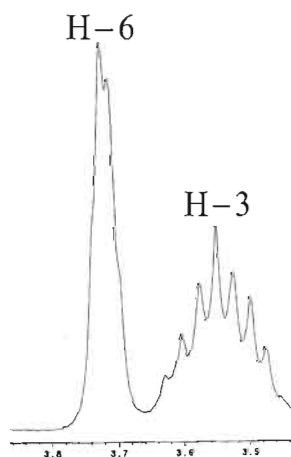


**Figure 4.19** Stéréoisomère possible lors de la réduction du carbonyle de **62**

Si on tient compte des conditions réactionnelles et du substrat (mésylate secondaire, toluène comme solvant, triéthylamine (une base encombrée)), il est logique de croire que l'élimination du mésylate **64a** s'est déroulée selon un mécanisme E<sub>2</sub>. Afin d'éliminer le mésylate formé dans le milieu réactionnel, il faut qu'il y ait un proton antipériplanaire à ce groupement. Ce pré-requis est présent chez le stéréoisomère **64a** (H<sub>5α</sub> et H<sub>7α</sub>) mais pas chez l'isomère **64b**. Aussi, l'élimination de H<sub>5α</sub> conduit à un alcène trisubstituée alors que l'élimination de H<sub>7α</sub> conduit à un alcène disubstituée. Or, il est connu qu'un alcène trisubstituée est plus stable qu'un alcène disubstituée<sup>(63)</sup>. On pourrait s'attendre que l'élimination de H<sub>5α</sub> serait favorisée par rapport à H<sub>7α</sub> pour cette raison. Il est donc clair à la lumière de ces informations que la réduction de **62** a du produire le stéréoisomère **63a**, qui dans les conditions de la réaction a conduit au mésylate **64a** puis à l'élimination de ce dernier par l'arrachement de H<sub>5α</sub>. Cette hypothèse nécessite quelques justifications car la formation de **63a** lors de la réduction est pour le moins surprenante. En effet, la réaction se déroulant dans un bain de glace à 0°C (et non dans des conditions cinétiques courantes), il aurait été logique d'observer la formation de **63b** car l'attaque axiale de l'hydruire aurait été favorisé d'un point de vue stéréoélectronique (état de transition chaise favorisé par rapport à l'état de transition bateau). Or, si vraiment c'est plutôt **63a** qui s'est formé, notre seule explication permettant d'expliquer cette sélection provient de l'encombrement stérique provoqué par le méthyle en C-10. Il semblerait qu'à 0°C

nous avons favorisé la formation du produit cinétique, l'hydrure ayant évité d'attaquer par-dessus à cause du méthyle en C-10. Nous allons maintenant montrer les indices qui prouveront hors de tout doute que c'est bien **63a** qui a été formé lors de la réduction de **62** et que c'est bien le proton  $H_{5\alpha}$  qui fut arraché lors de l'élimination.

Nous avons pu constater dans ce chapitre les différences flagrantes observées dans le spectre RMN  $^1H$  des différents alcools préparés selon la stéréochimie du groupement hydroxyle. En particulier, lors de la synthèse des alcools **33** et **36**, épimères en C-3, nous avons démontré que la multiplicité observée est en accord avec la règle de Karplus. Ainsi, il devrait être possible d'appliquer un raisonnement similaire à **63a** celui-ci étant aussi un alcool stéroïdien similaire à **33** et **36**. La figure 4.20 montre les signaux RMN  $^1H$  de l'hydrogène en C-3 et en C-6.

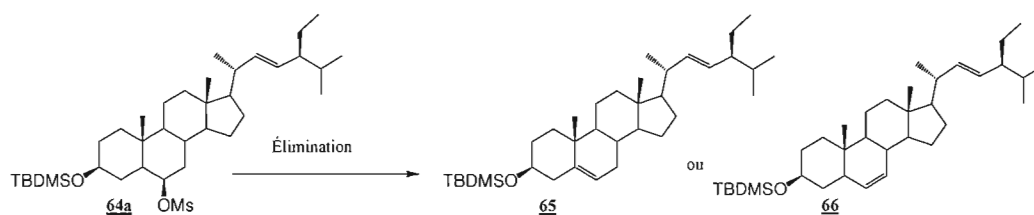


**Figure 4.20** Signaux RMN  $^1H$  à 200 MHz dans  $CDCl_3$  des hydrogènes en C-3 et C-6 de **63a**

Le signal de l'hydrogène en C-6 a l'apparence d'un singulet élargi comme dans le cas de **36**. Dans le cas de **63a** cet hydrogène devrait subir un couplage faible avec  $H_{5\alpha}$ ,  $H_{7\alpha}$  et  $H_{7\beta}$ . Ceci est une situation très similaire à celle de **36** où l'on y observait 4

couplages faibles. Le multiplet observé chez **63a** n'est pas parfaitement un singulet élargi mais les constantes de couplages  $y$  sont sans aucun doute très faibles. De plus, rappelons que cette comparaison avec **36** est d'autant plus valable que nous avons prouvé la stéréochimie de son épimère acétylé **55** par RMN  $^1\text{H}$  NOESY. Une autre preuve des faibles valeurs des constantes de couplages dans le signal de H-6 de **63** est présent dans la figure 4.20. On y voit une comparaison directe avec le multiplet de H-3 (2 couplages forts, 2 couplages faibles). Selon l'échelle du spectre il est évident que les constantes de couplages sont plus importantes pour H-3 que pour H-6, le multiplet de H-3 étant étendu sur une plus grande plage en ppm que celui de H-6. Ceci prouve donc que le signal de H-6 équatoriale est constitué de couplages plus faibles que H-3 qui est en position axiale. À la lumière de notre longue discussion sur la règle de Karplus à la section 4.3, il est donc clair que l'alcool en C-6 est bien en position  $\beta$  (ce qui confirme notre hypothèse précédente que le produit résulte d'une attaque de l'hydrure à la face opposé au Me en C-10).

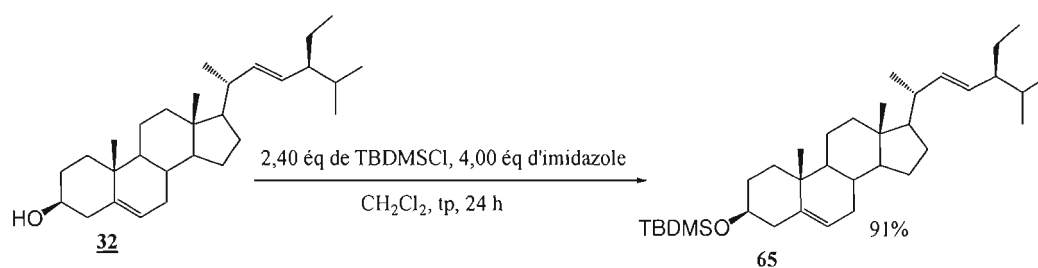
Il nous faut maintenant prouver que c'est bien l'hydrogène  $\text{H}_{5\alpha}$  qui a été arraché lors de l'élimination. Cette justification est relativement simple à la lumière des informations de la figure suivante.



**Figure 4.21** Produits possibles formés lors de l'élimination du mésylate **64a**

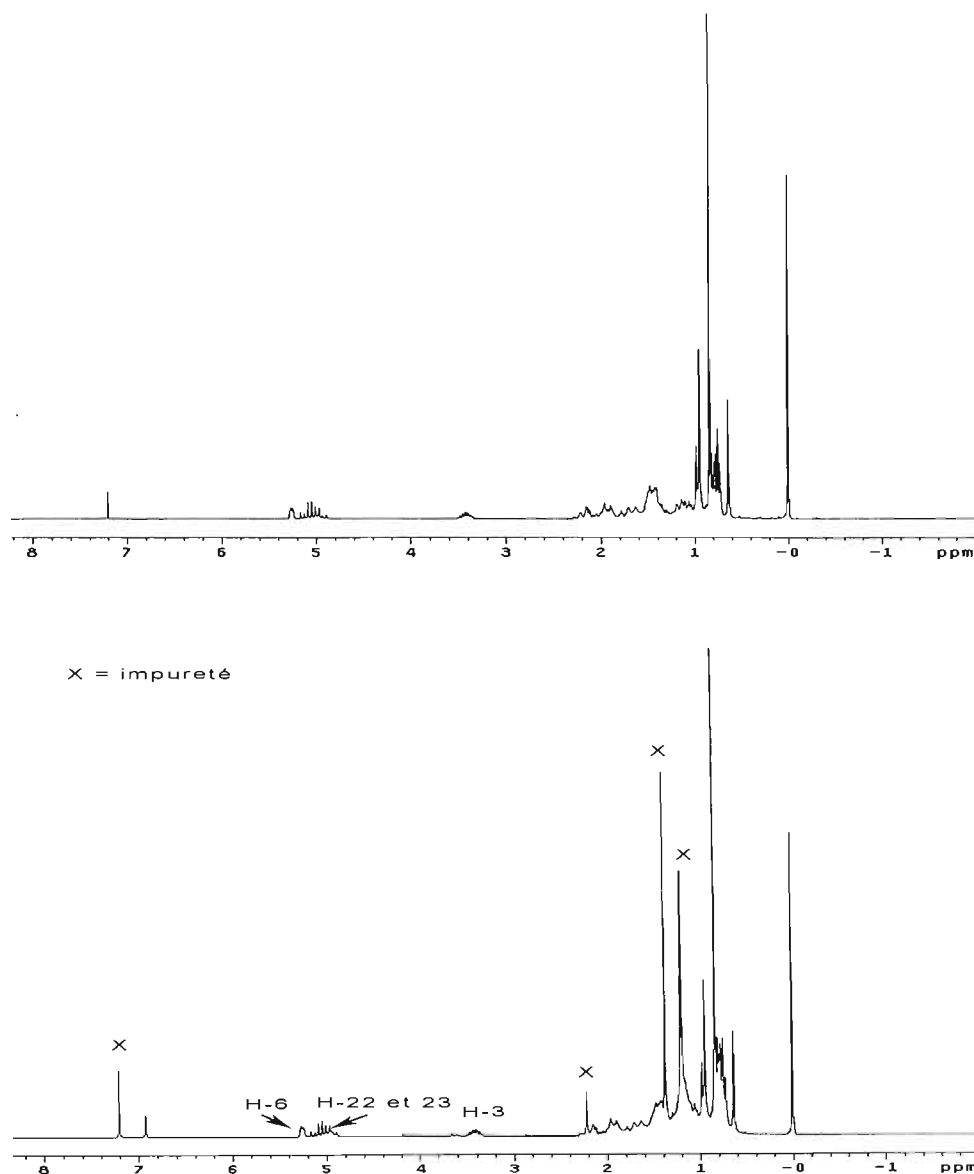
Ainsi, pour **65** on devrait observer au total 3 signaux de protons alcéniques en RMN  $^1\text{H}$  (les 2 sur la chaîne alkyle et celui du lien alcénique interne) alors que l'on devrait en observer 4 pour **66** (l'alcène cyclique étant disubstitué). Notons aussi qu'il est

connu qu'en général le déplacement chimique des hydrogènes d'un alcène disubstitué est différent d'un alcène trisubstitué<sup>(57)</sup> en RMN. Finalement, on remarque que **65** n'est que le stigmasterol **32** dont son alcool est protégé sous forme d'éther *t*-butyldiméthylsilylé. En préparant **65** à partir de **32** on devrait être en mesure de prouver avec certitude lequel des produits d'élimination est formé par comparaison des RMN obtenus. La préparation de **65** à partir de **32** est triviale (figure 4.22) et fournit un rendement excellent de 91%.



**Figure 4.22** Préparation de l'éther silylé **65** à partir du stigmasterol (**32**)

La figure 4.23 montre un à la suite de l'autre le spectre RMN  $^1\text{H}$  de **65** et du produit obtenu lors de la méthylation de **63**. Le produit d'élimination contient cependant quelques impuretés mais nous fournit néanmoins l'information requise. Dans les deux spectres on y voit bel et bien 3 signaux d'hydrogène alcéniques identiques (les deux *dd* de H-22 et H-23 à 5,0 ppm et H-6 à 5,20 ppm). Cette comparaison prouve donc que le produit d'élimination observé lors de l'élimination est bel et bien **65**.



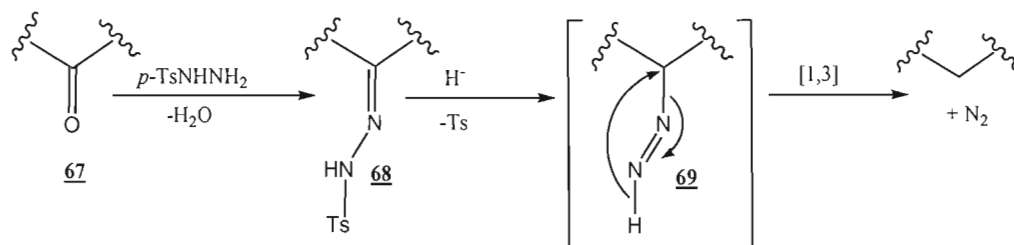
**Figure 4.23** Comparaison des RMN  $^1\text{H}$  à 200 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  de **65** (haut) et du produit d'élimination observé lors de la méthylation de **63** (bas)

Le rendement obtenu en produit d'élimination fut de 28% (mais contient des impuretés) la masse restante étant l'alcool de départ. Le rendement global de

l'élimination est probablement faible à cause de la stéréochimie de l'alcool en C-6. Celui-ci est à proximité du méthyle en C-10 ce qui implique que la mésylation doit être défavorisé par cet effet stérique. Quoi qu'il en soit, notre méthode pour la décarbonylation était donc voué à l'échec. Malgré le fait qu'il aurait peut-être été possible de trouver des conditions de réduction favorisant la formation de l'alcool en position équatoriale, nous avons décidé de mettre au point une autre méthode par crainte d'avoir à essayer de multiples conditions différentes pour éviter la formation de mélange de stéréoisomères.

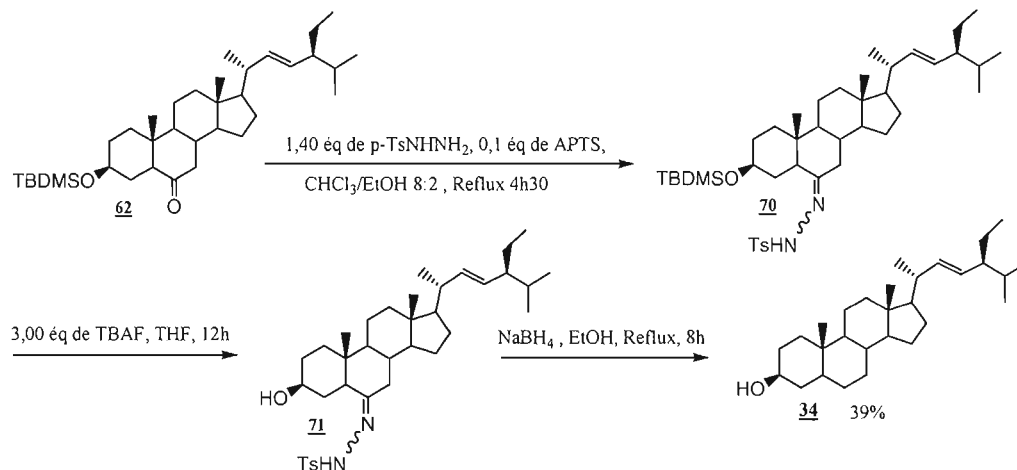
#### 4.6 Réduction de l'alcool **33** par l'utilisation d'une hydrazone

Notre première tentative de réduction ayant échouée, nous nous sommes tourné vers d'autres alternatives pour saturer le C=O en C-6. Nous avons choisi une méthode intéressante utilisant la p-toluènesulfonyl hydrazone<sup>(64)</sup>. La réaction se fait en deux étapes et ne nécessite pas l'utilisation de conditions ou de réactifs sévères. La décarbonylation dans ces conditions se déroule en étapes. Dans un premier temps, on réalise l'addition de p-TsNHNH<sub>2</sub> sur le carbonyle **67** de manière à générer le produit de condensation **68** correspondant avec un lien C=N (figure 4.24). Ensuite, il faut ajouter une source d'hydrure dans le milieu réactionnel. L'hydrure, dans un premier temps, vient réduire le lien C=N du produit de condensation ce qui mène à l'expulsion de son groupement sulfonate et la formation du lien N=N de (**69**). Un réarrangement d'hydrogène mène ensuite à l'expulsion d'azote et la libération du produit décarbonylé désiré. Même si la migration d'hydrogène n'est pas permis de manière suprafaciale selon la théorie des orbitales frontières<sup>(65)</sup> (c'est un réarrangement sigmatropique [1,3] ), on peut penser que sa réalisation est probablement dû au fait que le réarrangement mène à l'expulsion d'azote moléculaire (ce qui favorise fortement la réaction d'un point de vue entropique).



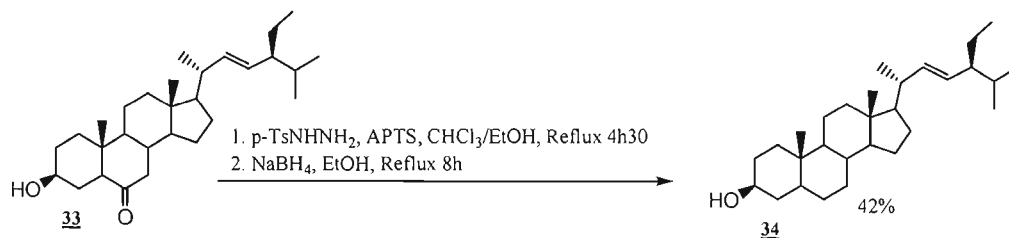
**Figure 4.24** Réduction d'une cétone avec *p*-TsNHNH<sub>2</sub>

Nous avons donc tenté d'appliquer cette séquence réactionnelle à notre alcool stéroïdien **33**. Cependant, par précaution, nous avons plutôt tenté la réaction sur sa forme protégée **62** (OTBDMS) afin de minimiser les réactions parasites possibles avec l'alcool en C-3. Notre premier essai ne fut guère satisfaisant. En effet, nous avons tenté la réaction en traitant directement **62** avec *p*-TsNHNH<sub>2</sub> dans un solvant à reflux sans utiliser de catalyseur acide tel que présenté dans notre article de référence<sup>(64)</sup>. Aucun produit de condensation ne fut observé dans ces conditions. Nous avons ensuite relancé la réaction en ajoutant cette fois-ci 0,1 éq d'acide *p*-toluènesulfonique comme catalyseur. Dans ces conditions, nous avons bel et bien observé la conversion totale de **62** en son produit de condensation **70** après 4h30 de réaction. **70** fut obtenu sous forme d'un mélange de stéréoisomères qui se dégrade lors de la purification par chromatographie éclair. De plus, l'analyse RMN <sup>1</sup>H du produit nous montre que le groupement OTBDMS en C-3 s'est partiellement déprotégée lors de la réaction probablement à cause de l'acide ajoutée. Nous avons donc traité directement le mélange obtenu avec le fluorure de *t*-butylammonium afin de déprotéger complètement le groupement silylé (figure 4.25). Par la suite nous avons porté à reflux notre composé déprotégé **71** dans l'EtOH en présence de NaBH<sub>4</sub> afin de compléter la réduction et d'obtenir **34**. Le rendement isolé global obtenu (3 étapes) fut de 39% (figure 4.25). La séquence conduisait bien cette fois-ci à **34** mais la séquence était inefficace.



**Figure 4.25** Réduction de **62** conduisant à l'alcool **34** en utilisant  $p\text{-TsNHNH}_2$

En effet, le groupement protecteur silylé se déprotégeait partiellement lors de la réaction ce qui le rendait inutile. Nous avons donc retenté la même séquence en utilisant cette fois-ci **33** directement (figure 4.26) dans les mêmes conditions réactionnelles que pour **62**. Le rendement global observé dans de telles conditions fut de 42% ce qui prouve à tout le moins que le groupement protecteur n'était pas requis. À noter que le rendement et les spectres RMN présentés pour cette molécule ne sont pas parfaits car ce résultat est préliminaire, ce fut la dernière manipulation effectuée sur ce travail.



**Figure 4.26** Réduction de **33** conduisant à l'alcool **34** en utilisant  $p\text{-TsNHNH}_2$



En bref, dans ce chapitre, nous avons montré qu'il est possible de préparer plusieurs précurseurs de brassinostéroïdes synthétiques et naturels tels que **33**, **34**, **36** et **54** à partir d'un seul composé soit la cétone pentacyclique **28**. Dans le prochain chapitre, nous verrons le résultat de l'oxydation du lien C-22,C-23 sur quelques uns de ces précurseurs.

## CHAPITRE V

### RÉACTIVITÉ DU LIEN C=C EN C-22, C-23 DES PRÉCURSEURS DES BRASSINOSTÉROÏDES

#### 5.1 Introduction

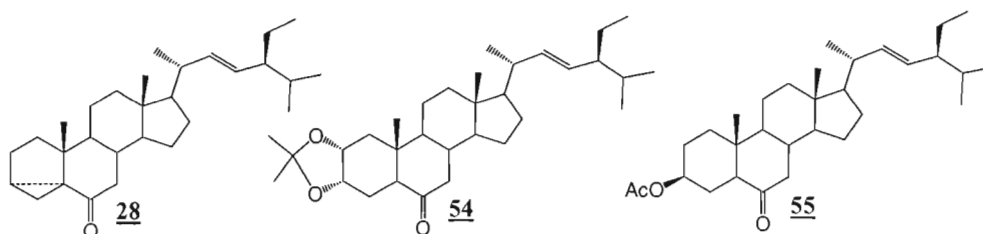
Au chapitre 3 nous avons vu que la dihydroxylation asymétrique nous permet d'obtenir la 28-homocastastérone (**24**) avec un rendement global de 20%. Cependant, la réaction produit un mélange inséparable de diastéréoisomères dans un ratio d'environ 1 : 1. Afin de contourner ce problème, nous avons mis au point un nouveau plan de synthèse faisant intervenir un aldéhyde en C-22. La clef de ce plan de synthèse est l'insertion stéréocontrôlée d'un nucléophile sur cet aldéhyde. À cette fin, nous avons abordé la synthèse de tous les précurseurs importants des brassinostéroïdes cibles au chapitre 4. Ces précurseurs possèdent déjà les groupements protecteurs appropriés et seule la dihydroxylation reste à effectuer. Dans ce chapitre, nous verrons les différentes études que nous avons effectuées quant à la dihydroxylation de ces molécules. De plus, nous aborderons aussi différentes réactions que nous avons tenté sur ce lien double en C-22,C-23 afin de démontrer la réactivité particulière de ce lien.

## 5.2 Réactivité du lien C=C en C-22,C-23 face à la dihydroxylation

Afin de généraliser la réactivité de nos molécules (et donc de notre méthode) nous avons testé trois de nos précurseurs dans diverses conditions de dihydroxylation. C'est ainsi que nous avons choisi de réaliser nos expériences sur la cétone pentacyclique **28**, le diol protégé sous forme d'acétonide **54** et sur l'acétate **55**. La cétone pentacyclique **28** possède l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de groupement protecteur. En effet, étant donné que le composé **28** ne possède que des fonctions électrophiles (cycle à 3 membres et cétone) et que la dihydroxylation ne fait intervenir aucun bon nucléophile, il semble inutile de protéger ces fonctions. De plus, la cétone **28** est facilement préparée en 3 étapes à partir du stigmastérol **32** (produit de départ). Pour ce qui est de l'acétonide **54** et de l'acétate **55**, notre choix s'explique par le fait que ces deux intermédiaires possèdent deux groupements protecteurs différents et chacun d'entre eux mène à une sous famille de brassinostéroïde différents (ceux avec deux groupements hydroxyles en position C-2 et C-3 et ceux sans OH en C-2). Ainsi ces trois molécules devraient ainsi nous permettre d'effectuer un mini balayage sur l'étendu de la réaction de dihydroxylation. En tout, nous avons effectué huit tentatives dans des conditions diverses avec les précurseurs mentionnés ci-haut. Ces essais sont présentés dans le **Tableau 5.1** à la page suivante.

**Tableau 5.1**

Évaluation de la réactivité des molécules **28**, **54** et **55** face à différentes méthodes de dihydroxylation.



Entrée	Substrat	Conditions Réactionnelles	Rendement
1	<b>54</b>	OsO <sub>4</sub> (0,03 éq), NMO(5,00 éq), NaHCO <sub>3</sub> , Acétone/Eau 9:1, 72h à 40 °C	Pas de réaction
2	<b>28</b>	OsO <sub>4</sub> (0,03 éq), NMO (5,00 éq), THF, tp, 20 jours	Pas de réaction
3	<b>28</b>	Conditions de Sharpless avec DHQ et MeSO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , tp, 36 jours	41%
4	<b>55</b>	OsO <sub>4</sub> (0,03 éq), NMO (5,00 éq), THF/H <sub>2</sub> O 8:2, 6 jours tp puis 4 jours à 40 °C	Pas de réaction
5	<b>55</b>	Conditions de Sharpless avec DHQ et MeSO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , tp, 20 jours	Pas de réaction
6	<b>55</b>	RuCl <sub>3</sub> (0,07 éq), NaIO <sub>4</sub> (1,50 éq), EtOAc/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O 3:3:2, 30 min	Traces d'aldéhyde
7	<b>55</b>	AcOAg (2,6 éq), I <sub>2</sub> (1,20 éq), AcOH, tp, 12h	Pas de réaction
8	<b>55</b>	AcOAg (2,6 éq), I <sub>2</sub> (1,20 éq), AcOH, Reflux 48h	Pas de réaction

Ces résultats méritent une discussion approfondie. Notre premier essai (entrée 1, **Tableau 5.1**) fut basée sur les travaux de McMorris<sup>(32)</sup>. Celui-ci affirme qu'il a pu obtenir le produit de dihydroxylation de **54** dans les conditions mentionnées après 6 jours de réaction (l'ajout de NaHCO<sub>3</sub> sert à empêcher la déprotection de l'acétone selon McMorris). Or, lorsque nous avons tenté la réaction nous n'avons pu reproduire ce résultat. Même après 3 jours les CCM ne montrent que la formation très faible de nouveaux produits. Le RMN<sup>1</sup>H du mélange réactionnel ne montre pas la formation du produit désiré. La même réaction à température ambiante en utilisant **28** et du THF comme solvant (**28** n'est pas soluble à température dans le mélange acétone/eau utilisé précédemment) n'a pas non plus conduit au produit désiré (entrée 2, **Tableau 5.1**). Nous avons ensuite réessayé cette réaction avec notre acétate **55** (entrée 4, **Tableau 5.1**). Au départ nous avons laissé la réaction à

température ambiante pendant 6 jours sans observer de changement en CCM. Nous avons ensuite porté à 40°C la réaction et l'avons suivi pendant 4 jours. Encore une fois nous n'avons rien observé de nouveau mis à part la déprotection partielle de l'acétate. Après ces 3 résultats décevants, nous avons décidé de retenter la même réaction mais utilisant les conditions de Sharpless<sup>(41,42)</sup> avec DHQ, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> et K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. On se rappellera qu'au chapitre 3 nous avons mentionné d'une part que l'auxiliaire chiral permet l'activation de l'osmium (et donc d'augmenter la vitesse de réaction) et d'autre part que l'ajout de méthanesulfonamide au mélange réactionnel aide à l'hydrolyse de l'intermédiaire de la réaction (ester d'osmium (VI)). L'ajout de ces 2 produits pourrait donc augmenter la réactivité de l'oxydant envers le lien double C-22, C-23. Même si dans ces conditions la dihydroxylation de **55** (entrée 5, **Tableau 5.1**) n'a pas fonctionné, elle a cependant donné des résultats pour **28** (entrée 3, **Tableau 5.1**). Dans le cas de la cétone pentacyclique **28**, nous avons réussi à obtenir le produit de dihydroxylation après 36 jours de réaction. Cependant, le produit fut très complexe à purifier et a nécessité l'utilisation de deux systèmes d'élution différents (voir partie expérimentale). Le rendement obtenu purifié fut de 41% ce qui est très décevant pour une réaction durant si longtemps. Il est bon de noter que le produit obtenu semble présent sous la forme d'un seul isomère selon son RMN <sup>13</sup>C. Il est impossible d'affirmer avec certitude la stéréochimie des alcools car nous n'avons pu trouver dans la littérature des données spectrales RMN <sup>13</sup>C pour les deux isomères possibles. Toutefois, nous avons cependant pu comparer avec les données spectrales du 28-homobrassinolide<sup>(66)</sup> et de son isomère 22 (*S*), 23 (*S*)<sup>(33)</sup>. Ainsi les alcools de la chaîne alkyle avec la configuration désiré 22 (*R*), 23 (*R*) devrait posséder un déplacement chimique de 73-72 ppm alors que ceux de l'isomère 22 (*S*), 23 (*S*) devrait être de 72-70 ppm. Or le spectre <sup>13</sup>C de **72** (le produit de dihydroxylation de **28**, figure 5.2, p.84) montre que ses deux alcools possèdent des déplacements chimiques de 72 et 70 ppm. On peut donc croire que l'on a plus à faire à l'isomère 22(*S*), 23(*S*) (isomère non naturel), mais on ne peut être certain à 100 % car la comparaison ne s'est pas fait avec des molécules parfaitement identiques. Notons aussi que la réaction n'est pas reproductible, nous avons tenté de la reproduire afin d'obtenir plus de produit afin de réaliser des expériences pour

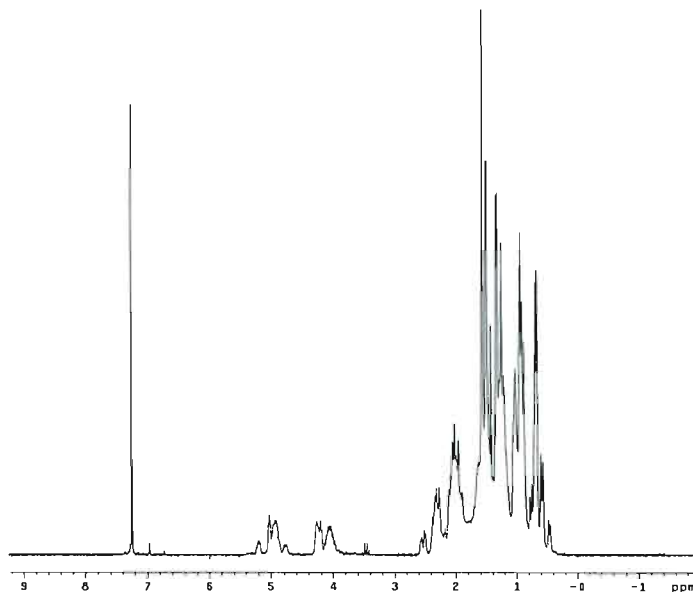
prouver la stéréochimie, mais elles ont toutes échouées. Ajoutons aussi que la nature difficile de la réaction a déjà été observée par Khripach<sup>(67)</sup>. En effet, il a noté que la réaction peut prendre de 1 à 5 semaines selon les essais réalisés ce qui démontre du moins la nature capricieuse de la réaction. Après ces résultats peu prometteurs avec le tétroxyde d'osmium, nous avons porté notre attention à des méthodes alternatives pour réaliser la dihydroxylation. Notre regard s'est d'abord posé sur le tétroxyde de ruthénium. Il est connu que RuO<sub>4</sub> est un oxydant beaucoup plus fort que OsO<sub>4</sub><sup>(68)</sup>. En effet celui-ci est en mesure de réaliser des dihydroxylations dans des temps très courts soit de quelques minutes. De plus, Shing et al<sup>(68)</sup> ont démontré que si la réaction dure plus de 3 min, on obtient en générale le produit de suroxydation soit l'aldéhyde ou l'acide (c'est ce que l'on cherche à obtenir ultimement). Cependant, ces chercheurs ont aussi montré que la méthode ne fonctionne pas très bien pour les substrats très encombrés. Nous avons tout de même tenté la réaction selon les conditions présentées par ces chercheurs (en générant RuO<sub>4</sub> *in situ*, car celui-ci est réactif et instable) et n'avons pas observé le produit de dihydroxylation (entrée 6, **Tableau 5.1**). Même en laissant la réaction 30 min, on n'obtient que l'aldéhyde à l'état de traces selon le spectre RMN <sup>1</sup>H du mélange réactionnel. L'encombrement stérique étant probablement responsable de la faible réactivité observée. Nous avons aussi trouvé un précédent dans la littérature à ce sujet. Hazra<sup>(69a)</sup> a montré que la dihydroxylation avec RuO<sub>4</sub> de l'acétonide **54** ne fournit qu'un rendement de 12% en produit de dihydroxylation (temps de réaction de 3 min comme pour Shing). Dans notre cas, nous avons tenté la réaction avec 50 mg de **55** et avons observé des traces de l'aldéhyde après 30 min en RMN. Étant donné que la réaction a été laissée longtemps le diol s'est probablement oxydé et le pic faible de l'aldéhyde observé sur le spectre RMN<sup>1</sup>H devait correspondre au 5 mg que l'on aurait dû obtenir selon Hazra (et du 45 mg de **55**). Quoi qu'il en soit, la dihydroxylation était encore une fois inefficace. Un rendement possible de 12% n'est guère utile au beau milieu d'une synthèse. Finalement en dernier recours nous avons tenté de procéder à la dihydroxylation en utilisant la réaction de Woodward<sup>(69b)</sup>. La réaction devrait produire un 1,2-iodoacétate que l'on pourra hydrolyser en milieu basique afin de générer un diol *cis*. La réaction

fut essayé tant à température ambiante qu'à reflux sur **55** (entrées 7 et 8, **Tableau 5.1**) et encore une fois aucune réaction ne fut observée. Le RMN ne montre pas la disparition du lien C=C dans les 2 cas. De plus, la réaction n'utilise que 1,20 éq d'iode moléculaire et on devrait en principe voir un changement de couleur lors de la réaction si celui-ci est consommé. Or, dans les deux cas le milieu réactionnel demeure rouge orangé ce qui prouve que l'iode moléculaire n'est pas consommé d'aucune façon lors de la réaction. Ces résultats sont particuliers car au chapitre 3 nous avons facilement réalisé la double dihydroxylation du diène **27**. Il semblerait que lorsque le lien C=C en C-2, C-3 n'est pas présent, la dihydroxylation en C-22, C-23 est inefficace. Il n'est pas simple d'expliquer ce résultat. Peut-être un échange ou un équilibre de l'osmium entre ces deux sites réactionnels permet de mener la réaction à terme, car du moins on a démontré la faible réactivité du lien C-22, C-23 lorsque celui-ci est le seul lien double présent. En bref, nos tentatives de dihydroxylation ont été infructueuses. Soit le rendement obtenu est trop faible, soit aucune réaction n'est observée, soit la réaction est trop longue (plusieurs jours) ou soit la réaction n'est pas reproductible. Ainsi, la dihydroxylation avec OsO<sub>4</sub>, RuO<sub>4</sub> et par la réaction de Woodward ne sont pas des méthodes efficaces pour former les diols de **28**, **54** et **55**. À la section suivante nous énoncerons notre hypothèse sur la raison qui défavorise cette dihydroxylation.

### 5.3 Hypothèse sur la faible réactivité des précurseurs **28**, **54** et **55** face à la dihydroxylation asymétrique

À première vue, il n'est pas simple de trouver une explication à la faible réactivité du lien alcénique en C-22, C-23. Cependant, quelques constatations expérimentales importantes nous fournissent des indices nous permettant de trouver une explication valable à ce phénomène. Un de ces indices est survenu lors de la double dihydroxylation du diène **27**. On se rappelle qu'au chapitre 3 nous avons essayé plusieurs méthodes afin de réaliser la séparation des diastéréoisomères de la 28-homocastastérone (**24**). Ainsi, on réalisait la transformation de **24** en son bis-

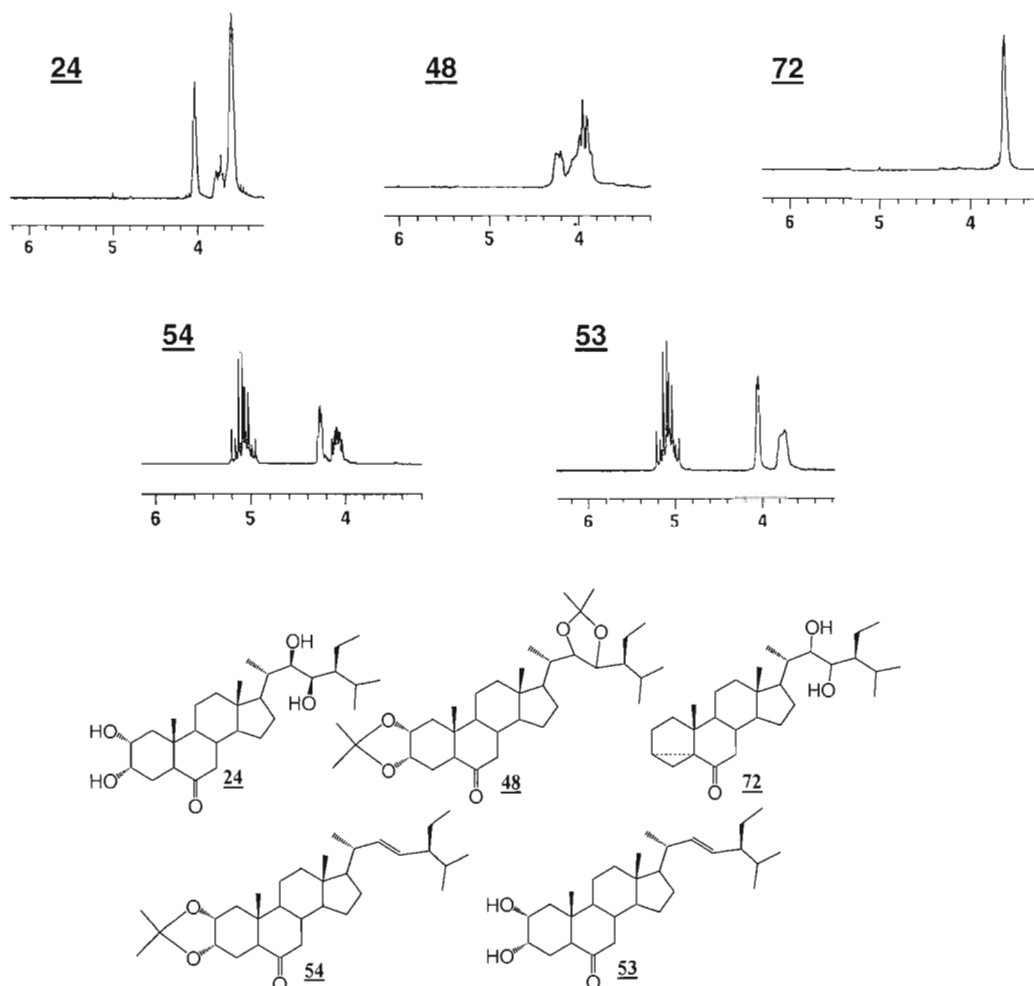
acétonide **48** pour essayer de séparer les isomères par chromatographie sur colonne. Or, lors de la purification de **48**, nous avons isolé le produit secondaire particulier (**73**) lors de la réaction. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce produit (figure 5.1) montre étrangement des signaux possédant une intégration de 2H à 5,00 ppm.



**Figure 5.1** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit secondaire **73** isolé lors de la purification de **48**.

On voit bel et bien les signaux de H-2 et H-3 dont les carbones sont liés aux oxygènes de l'acétonide à 4,00-4,20 ppm mais où sont les signaux de H-22 et H-23 (qui devraient être dans la même région)? On pourrait donc croire que le multiplet à 5,00 ppm correspond à ces hydrogènes, cependant le déplacement chimique est beaucoup trop élevé. De plus, l'ensemble des données spectrales que nous avons accumulé jusqu'à présent (figure 5.2) semble limiter la nature du groupement possible provoquant ce déplacement chimique important.

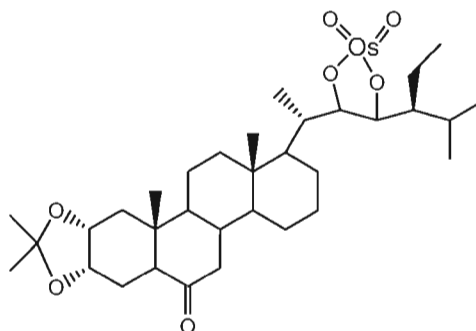




**Figure 5.2** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  de **24**, **48**, **53**, **54** et **72** entre 3,4 et 6,0 ppm

En effet, grâce à la figure 5.2, on remarque d'abord qu'aucun signal n'est présent dans la zone de 5,00 ppm mis à part les protons en  $\text{C}=\text{C}$  du lien C-22,C-23. Or **73** a été isolé lors de la purification du bis-acétonide **48** qui ne possède plus d'insaturation. De plus, le multiplet présent dans le spectre RMN de **73** (figure 5.1) à 5,00 ppm ne possède pas la multiplicité requise de deux *dd* que l'on peut observer chez **53** et **54**. Notons aussi que tant les signaux des hydrogènes sur les carbones liés à un alcool que ceux liés à l'oxygène d'un acétonide apparaissent entre 3,60 et

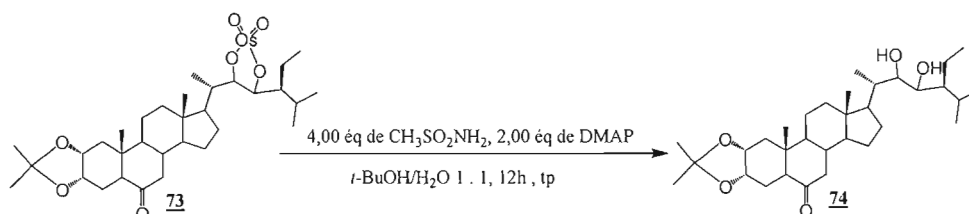
4,20 ppm. Grâce au RMN de **72** et de **24**, on peut éliminer la possibilité que ce soit des alcools déprotégés qui forment le signal à 5,00 ppm sur le spectre de **73**, car les spectres de **73** et **24** montrent que le signal des H-22 et H-23 des alcools libres apparaît vers les 3,60 ppm. Finalement, le spectre du bis-acétonide **48** montre que les quatre hydrogènes de H-2, H-3, H-22 et H-23 sortent sous la forme d'un multiplet complexe entre 3,8 et 4,3 ppm. Ces données spectrales nous laisse croire que l'acétonide en C-2, C-3 est bien présent chez **73**, car de 4,00 à 4,20 ppm on y retrouve bel et bien un multiplet intégrant pour 2 hydrogènes avec une allure similaire à celle de l'acétonide simple **54**. En réfléchissant bien à ces données, notre conclusion fut que les hydrogènes en C-22, C-23 devaient être liés à un groupement fortement électroattracteur. Or, le milieu réactionnel ne contient que OsO<sub>4</sub> ou DHQ qui pourrait venir se lier aux oxygènes en C-22, C-23. On peut éliminer rapidement DHQ car le spectre RMN <sup>1</sup>H de **73** ne montre pas la présence de signaux aromatiques. Ainsi, on pourrait penser que **73** soit en fait constitué d'un acétonide en C-2, C-3 et d'un ester d'osmium (VI) en C-22, C-23 (figure 5.3).



**Figure 5.3** Structure hypothétique du produit secondaire **73**

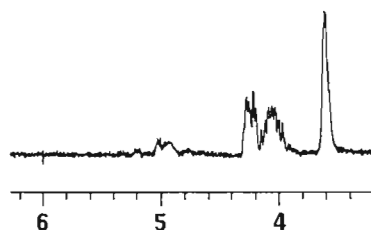
Afin de prouver notre hypothèse nous avons tenté d'hydrolyser **73**. S'il ne s'est pas hydrolysé lors de la dihydroxylation avec CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> ceci implique que son hydrolyse est difficile. Nous avons donc traité **73** avec un excès important de CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (4,00 éq) et DMAP (2,00 éq) sachant que les amines ont une forte affinité pour l'osmium (figure 5.4). Un indice expérimental important que **73** contient

un métal de transition peut être observé par le changement de couleur du mélange réactionnel. Il passe de l'orangé au violet puis au noir dans l'espace de 12h.



**Figure 5.4** Hydrolyse de l'ester d'osmium **73** par un mélange d'amines

Nous avons ensuite enregistré le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit d'hydrolyse **74** de **73** et nous présentons la zone entre 3,4 ppm et 6,00 ppm à la figure 5.5.



**Figure 5.5** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit d'hydrolyse **74** entre 3,4 et 6,2 ppm

On remarque d'abord que le signal à 5,00 ppm est presque éliminé ce qui renforce notre hypothèse que c'était bien un ester d'osmium en C-22,C-23, car selon nous aucun autre groupement présent dans les conditions de la dihydroxylation de Sharpless, peut être hydrolysé par une amine en milieu alcoolique aqueux à température ambiante. De plus, on remarque aussi l'apparition d'un singulet élargi à 3,60 ppm. Ce signal doit nécessairement être celui de H-22 et H-23 lorsque que

leurs carbones est lié à un alcool. La raison est simple car la préparation ardue de **72** nous a permis de déterminer avec précision la position de ces hydrogènes sur le spectre RMN (figure 5.2). En effet, **72** qui est notre cétone pentacyclique dihydroxylée, est un excellent modèle pour observer le déplacement chimique de ces hydrogènes (elle ne contient que des OH que sur sa chaîne alkyle) si on la compare à tous les autres différents précurseurs que nous avons préparés (figure 5.2). Ainsi, le signal de ces hydrogènes est sous la forme d'un singulet élargi à 3,60 ppm. Ceci concorde parfaitement avec le signal obtenu pour **73**. Une dernière constatation expérimentale intéressante permet de renforcer notre théorie sur la structure de **73**. Lorsque nous avons hydrolysé **73** nous avons 11,2 mg de produit de départ. Étant donné que nous avons seulement procédé à une extraction pour récupérer **74** et que celui semble relativement pur selon le spectre RMN  $^1\text{H}$ , la masse obtenue en **74** pourrait être témoin de la perte de l'atome d'osmium. En effet, l'osmium est très lourd et sa perte devrait entraîner une diminution de la masse de produit récolté de **74**. La masse molaire de **73** est de 738,98 g/mol alors que celle de **74** est de 518,77 g/mol. Ainsi on devrait en toute logique voir une perte de 30% en masse de **74** lors de la réaction. Nous aurions été supposé obtenir 8 mg de **74** et nous avons obtenu environ 6 mg de **73**. Si on considère les pertes possibles lors des manipulations, la masse obtenue correspond relativement bien à la valeur attendue. Avec les observations expérimentales et les spectres RMN $^1\text{H}$ , il semble subsister peu de doutes sur la véritable nature de **73**. Ce qui est encore plus intéressant c'est que nous avons rencontré à plusieurs reprises les esters d'osmium de nos produits, notamment lors de la dihydroxylation de l'acétate **55** (entrée 5, **Tableau 5.1**). Le fait que nous avons pu isoler cet intermédiaire a des conséquences importantes sur la faisabilité de la dihydroxylation du lien C=C en C-22, C-23.

En effet, nous savons que dans les réactions de dihydroxylation, l'osmium est utilisé en quantité catalytique car il est extrêmement toxique<sup>(68)</sup>. Ainsi, en temps normal, le tétr oxyde d'osmium (VIII) réagit avec l'alcène pour former un ester d'osmium (VI). L'ester d'osmium s'hydrolyse ensuite dans le milieu réactionnel ce qui libère de l'osmium (VI). Le co-oxydant de la réaction réoxyde ensuite l'osmium (VI) en tétr oxyde d'osmium (VIII) et le cycle catalytique se poursuit ainsi jusqu'à la réaction

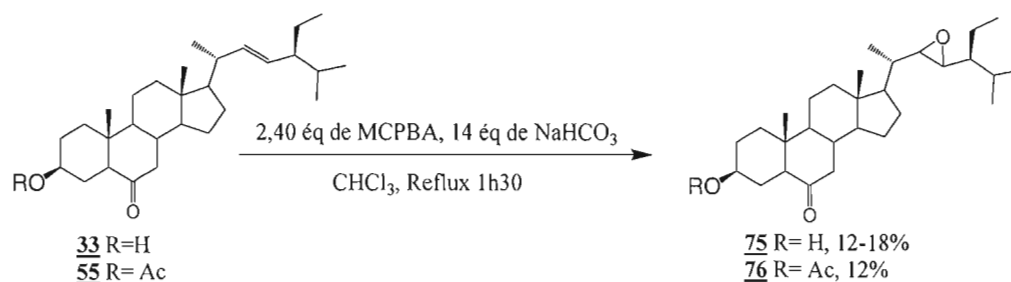
complète de l'alcène. Or, nous avons été en mesure d'isoler l'ester d'osmium lors de la formation de la 28-homocastastérone (**24**) (rendement de 48% en **24**) et lors de la dihydroxylation infructueuse de **55**. Ceci indique qu'une partie de l'ester d'osmium ne s'est pas hydrolysé. Si une partie de l'osmium est séquestrée, la réaction doit nécessairement être ralentie et donc les temps élevés de réaction (ou les échecs de réaction) sont sûrement contrôlés par l'hydrolyse de cet intermédiaire. Dans le cas de la dihydroxylation de **55**, nous avons seulement isolé ce nouveau produit lors de la réaction (et le produit de déprotection de l'acétate). Il peut donc être logique de penser que si tout l'osmium fut séquestré sous forme d'ester, aucune réaction (mis a part la formation du produit de dihydroxylation en quantité catalytique) ne s'est déroulée. Notons aussi que les esters isolés ont une coloration jaune qui tend vers le vert. Or, même si nous n'avons pas isolé formellement ces intermédiaires lors de tous nos essais de dihydroxylation, dans tous les cas les solides obtenus avaient cette même coloration. Cette constatation pourrait donc expliquer la faible réactivité du lien C-22,C-23 face à la dihydroxylation. Il est d'ailleurs rapporté que plus l'ester est encombré, plus difficile il est à hydrolyser<sup>(43)</sup>. À la lumière de toute cette discussion, il semblerait que l'hydrolyse difficile de l'ester d'osmium (VI) fait que le cycle catalytique est rompu et que la réaction ne peut être menée à terme.

Étant donné que notre mélange d'amine a réussi à hydrolyser l'ester d'osmium **73**, pourrions nous utiliser un tel mélange lors de réactions de dihydroxylation? Nous ne pouvons malheureusement pas car l'hydrolyse de **73** a nécessité plusieurs équivalents d'amines et on ne pourrait utiliser un tel mélange lors de la réaction étant donné que l'on risquerait de surcharger l'osmium. Étant donné que l'osmium a une forte affinité pour les amines, une trop forte concentration rendrait difficile la régénération de l'osmium (VIII) avec le co-oxydant et l'eau. Ainsi, ultimement il faudrait trouver une alternative qui viendrait contourner ce problème. Nous avons essayé la réaction de Woodward à la section 5.2 (**Tableau 5.1**) qui ne fait pas intervenir d'osmium, mais la réaction n'a pas fonctionnée. Nous avons donc consulté la littérature chimique afin de trouver une autre alternative pour effectuer une

dihydroxylation. À la section suivante nous verrons nos résultats pour l'époxydation de ce lien en C-22,C-23.

#### 5.4 L'époxydation, un moyen de contourner la dihydroxylation asymétrique catalytique

En examinant plusieurs références sur la chimie des stéroïdes, nous avons été en mesure d'obtenir certains exemples d'époxydation du lien double en C-22,C-23 de dérivés du stigmastérol. En particulier, Timofeev<sup>(70)</sup> a montré que l'époxydation de l'acétate de stigmastérol est une transformation très simple à réaliser avec des rendements de 50-70%. De plus, l'équipe de Timofeev a aussi démontré que ces dérivés ne sont pas cytotoxiques. Ce résultat est intéressant d'une part parce qu'il montre que l'époxydation devrait être réalisable et d'autre part que les molécules obtenus ne sont pas toxiques ce qui implique que ces dérivés époxydés pourrait venir enrichir notre modèle RSA. De plus, les dérivés époxydés pourraient être utiles dans la synthèse de brassinostéroïdes plus rares. En effet, certains brassinostéroïdes moins courant comme la cathastérone (un alcool en C-3 et un alcool en C-22) ne possèdent qu'un alcool sur leur chaîne alkyle. L'ouverture régiosélective de l'époxyde avec un hydrure pourrait ainsi générer le motif désiré. N'oublions pas non plus notre objectif principal, c'est-à-dire la synthèse de nos brassinostéroïdes cibles. L'ouverture de l'époxyde en milieu aqueux devrait fournir un mélange de diol *trans* que l'on pourra cliver avec le périodate pour générer le même aldéhyde que la dihydroxylation avec OsO<sub>4</sub> n'a pu nous fournir. Nos premiers essais ont été réalisés sur l'acétate **55** et sur l'alcool **33**. Lorsque traité avec MCPBA dans les conditions de Timofeev<sup>(70)</sup>, **55** et **33** ont bel et bien menés à la formation des époxydes désirés **75** et **76** (figure 5.6). Cependant les rendements obtenus furent très faibles soit de 12 à 18 % .

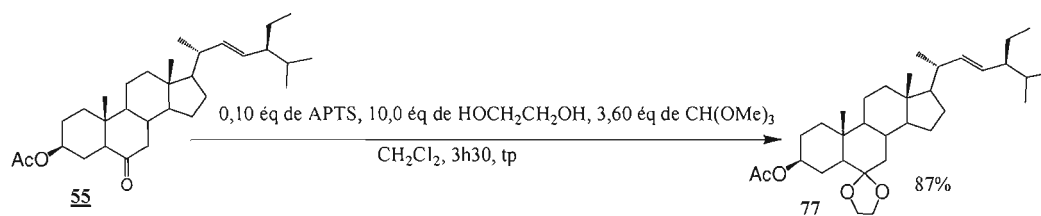


**Figure 5.6** \u00c9poxydation de l'alcool 33 et de l'ac\u00e9tate 55

Dans les deux cas, la r\u00e9action a men\u00e9 \u00e0 la formation de nombreux produits secondaires que nous n'avons pas pu caract\u00e9riser. La raison principale vient des groupements r\u00e9actifs face \u00e0 MCPBA qui ne sont pas prot\u00e9g\u00e9s. D'abord tant dans 33 que 55 les deux carbonyles peuvent r\u00e9agir avec MCPBA pour conduire \u00e0 un m\u00e9lange de produits r\u00e9sultant \u00e0 la fois de l'\u00e9poxydation et de la lactonisation de Baeyer-Villiger \u00e9tant donn\u00e9 que nous sommes \u00e0 reflux dans CHCl<sub>3</sub>. De plus, l'alcool 33 risque de subir des r\u00e9actions parasites \u00e9tant donn\u00e9 la pr\u00e9sence d'un oxydant dans le milieu r\u00e9actionnel. Afin d'\u00e9liminer les r\u00e9actions parasites nous devons donc prot\u00e9ger ces fonctions. C'est ainsi que nous avons choisi de prot\u00e9ger le carbonyle en C-6 sous forme d'un ac\u00e9tal et de prot\u00e9ger l'alcool en C-3 sous forme d'\u00e9ther silyl\u00e9. La m\u00eame r\u00e9action sur l'ac\u00e9tate 55 a fourni un rendement similaire \u00e0 l'alcool 33 lors de l'\u00e9poxydation, ce groupement protecteur ne semble donc pas ad\u00e9quat pour la r\u00e9action. Nous avons donc opt\u00e9 de prot\u00e9ger l'alcool en C-3 sous forme de TBDMS. De plus, l'ac\u00e9tal et le TBDMS ont de bonnes chances de r\u00e9sister au clivage oxydatif au p\u00e9riodate. En effet, il a \u00e9t\u00e9 d\u00e9montr\u00e9e qu'en diminuant le pouvoir oxydant et acide de l'acide p\u00e9riodique avec de la pyridine, les groupements sensibles aux acides tels que les ac\u00e9tonides r\u00e9sistaient \u00e0 ces conditions<sup>(32)</sup>.

C'est ainsi que dans un premier temps, nous avons tent\u00e9 de prot\u00e9ger le carbonyle de 55 en C-6 par la m\u00e9thode classique utilisant l'\u00e9thane-1,2-diol et l'acide *p*-tolu\u00e8nesulfonique dans du tolu\u00e8ne \u00e0 reflux avec un condenseur de type Dean-Stark. Cependant, dans ces conditions nous n'avons pu r\u00e9ussir \u00e0 obtenir le c\u00e9tal d\u00e9sir\u00e9 (on

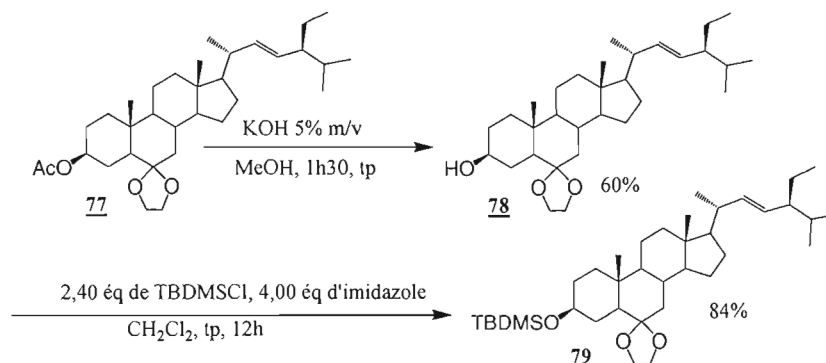
observait plutôt un mélange complexe de produit en RMN  $^1\text{H}$ ). Heureusement, nous avons trouvé un exemple de protection de carbonyle stéroïdien dans la littérature<sup>(71)</sup> qui ne nécessitait pas l'utilisation d'un chauffage à reflux, mais plutôt l'utilisation du triméthylorthoformate pour piéger l'eau formée et déplacer l'équilibre vers la formation du cétal. Dans ces conditions, nous avons réussi à protéger l'acétate **55** en son cétal **77** avec un rendement purifié de 87% (figure 5.7).



**Figure 5.7** Protection du carbonyle en C-6 de l'acétate **55** en céthal **77**

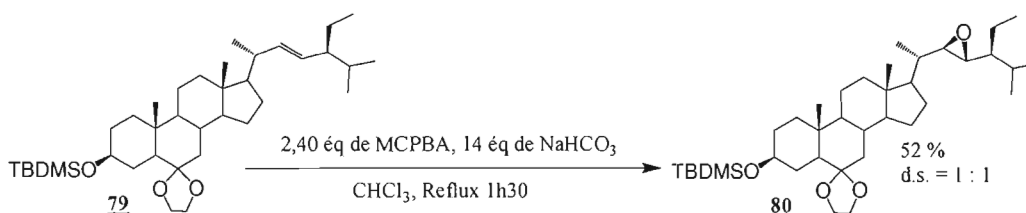
L'hydrolyse de l'acétate de **77** pour donner l'alcool **78** suivi de la protection de cet alcool avec TBDMSCl pour donner **79** s'est bien déroulé avec des rendements respectifs de 60% et 84% (figure 5.8). Le rendement faible obtenu pour l'hydrolyse en alcool **78** s'explique par le fait que le produit est présent sous forme d'une mousse amorphe qui est très difficile à purifier/manipuler. Une fois la molécule doublement protégée **79** obtenue, nous avons ensuite tenté l'époxydation sur ce précurseur.





**Figure 5.8** Hydrolyse de l'acétate **77** générant l'alcool **78** qui est ensuite protégé sous forme d'éther silylé **79**

Encore une fois, en utilisant les conditions de Timofeev<sup>(70)</sup>, nous avons été heureux d'obtenir l'époxyde **80** avec un rendement purifié de 52% (figure 5.9). Ce rendement était beaucoup plus intéressant que les rendements obtenus avec **33** et **55** (12-18%). Notre analyse par CPG-SM montre que l'époxyde est présent sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères 1 : 1.



**Figure 5.9** Formation de l'époxyde **80** à partir de l'alcène **79**

Ayant obtenu l'époxyde **80**, on devrait être en mesure d'obtenir le diol désiré en procédant à l'ouverture de l'époxyde. Nous avons d'abord tenté l'ouverture dans les conditions de Qu<sup>(72)</sup>. Celui-ci a montré que l'eau peut simplement mener à l'ouverture d'époxydes même si ceux-ci sont insolubles dans celle-ci (par exemple l'époxyde du styrène). Ainsi, même les substrats insolubles et encombrés voient leurs époxydes se faire ouvrir graduellement par l'eau après 36h. Cette voie est attrayante car elle

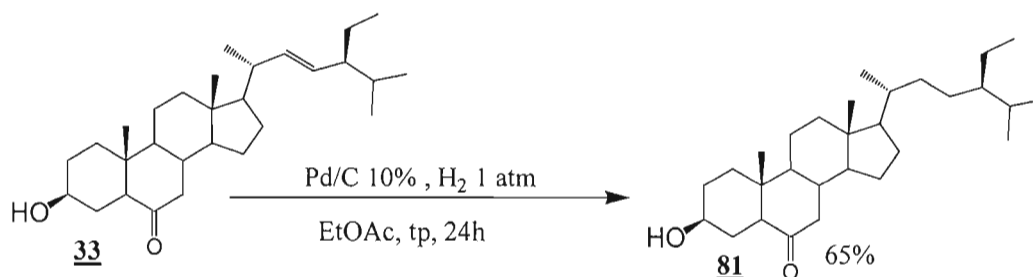
éviterait d'utiliser des conditions acides qui risqueraient de détruire nos groupements protecteurs (qui sont requis pour réaliser le clivage oxydatif). Nous avons ainsi essayé de faire réagir **80** pendant 48h dans l'eau sans voir la formation de nouveaux produits même à l'état de traces en RMN  $^1\text{H}$ . Nous avons alors tenté une autre approche en utilisant une solution 2M de NaOH dans du dioxanne en chauffant à reflux pendant plusieurs heures. Encore une fois, aucun produit d'ouverture ne s'est formé. Par manque de temps nous n'avons pu essayer d'autres conditions pour l'ouverture de cet époxyde. Cependant, il devrait être possible de réaliser son ouverture en milieu basique car son ouverture par les nucléophiles forts (lithiens, grignards) est connu<sup>(40)</sup>.

Lors de la poursuite des travaux par le groupe de recherche, même si l'ouverture de l'époxyde échoue, nous aurons tout de même un plan de secours pour générer l'aldéhyde en C-22. En effet, il a été rapporté que l'ozonolyse du lien C=C en C-22, C-23 est possible et mène à la formation de l'aldéhyde avec un rendement de 48%<sup>(32)</sup>. Nous n'avons pas essayé cette voie étant donné que tant le groupe de recherche que l'université ne possédaient l'ozonolyseur requis pour la transformation.

Avant de passer à la conclusion de la chimie effectuée dans ce travail, nous allons rapporter une autre réaction qui a fonctionné sur le lien C=C en C-22,C-23. Même si cette réaction n'est pas une oxydation menant à un de nos intermédiaires cibles, elle permet au moins d'apprécier la réactivité particulière de ce lien en plus d'enrichir notre modèle RSA.

### 5.5 L'hydrogénation catalytique permet la réduction du lien C=C en C-22, C-23

Comme nous le verrons au chapitre 6, nous avons évalué le potentiel neuroprotecteur de plusieurs brassinostéroïdes et de plusieurs de leurs précurseurs. Or, certains de ces précurseurs possèdent un lien C=C en C-22, C-23 et, afin de vérifier l'effet de ce lien sur le potentiel neuroprotecteur de ces molécules, nous avons décidé de le réduire. Nous avons décidé de tenter la réaction sur l'alcool **33** étant donné qu'il est facilement préparé en grande quantité. C'est ainsi que nous avons réalisé l'hydrogénation catalytique dans les conditions classiques en utilisant Pd/C comme catalyseur. En traitant **33** dans les conditions décrites à la figure 5.10, nous avons réussi à obtenir le produit réduit **81** avec un rendement purifié de 65%.



**Figure 5.10** Hydrogénation catalytique de l'alcool **33**

Ainsi, l'hydrogénation catalytique et l'époxydation sont deux réactions qui fonctionnent très bien sur ce lien C=C qui nous a donné tant de problèmes. Ceci conclut donc toute la chimie effectuée dans ce travail, il est maintenant temps de faire une synthèse de ce que nous avons réalisé.

## 5.6 Conclusions

Le premier objectif de ce travail de recherche était de réaliser la synthèse de plusieurs brassinostéroïdes. Nous avons été en mesure de préparer la 28-homocastastérone (**24**) à partir du stigmastérol (**32**) avec un rendement global de 20% (5 étapes). Cependant celle-ci fut obtenue sous forme d'un mélange 1 : 1 avec son diastéréoisomère 22 (*S*), 23 (*S*) non désiré. Nos tentatives de séparation du mélange en passant par le bis-acétonide **48** et le tétraacétate **49** n'ont pas fonctionné. Nous avons donc mis en place un nouveau plan de synthèse faisant intervenir un aldéhyde en position C-22. Afin de former cet aldéhyde, nous avons planifié de préparer tous les précurseurs de nos brassinostéroïdes tant synthétiques que naturels et de procéder à la dihydroxylation de leur lien C=C en C-22, C-23. C'est ainsi que nous avons préparé le diol **53**, les épimères **32** et **36** avec un alcool en C-3 et l'alcool en C-3 sans carbonyle en C-6 **34**. La stéréochimie des précurseurs **33** et **36** fut prouvée par la règle de Karplus et par une expérience RMN <sup>1</sup>H NOESY. Les rendements globaux obtenus à partir du stigmastérol pour ces précurseurs furent de 24% (5 étapes) pour **53**, 39% (5 étapes) pour **33**, 19% pour **36** (7 étapes) et 12% (7 étapes) pour **34**. Nos tentatives de dihydroxylations avec OsO<sub>4</sub> et RuO<sub>4</sub> de la cétone pentacyclique **28**, de l'acétate **55** et du diol protégé sous forme d'acétonide **54** furent infructueuses. Nos résultats expérimentaux semblent montrer que l'hydrolyse difficile de l'ester d'osmium (VI) lors de la réaction empêche le cycle catalytique de bien fonctionner et donc de permettre la dihydroxylation de ces précurseurs. Afin de contourner la dihydroxylation asymétrique nous avons réalisé la synthèse de l'intermédiaire possédant 2 groupements protecteurs **79** (7 étapes, 19% de rendement) que nous avons réussi à époxyder avec un rendement de 52%. Nos études préliminaires d'ouverture de cet époxyde ont échouées mais d'autres études sont prévues dans le futur. Finalement nous avons montré que l'hydrogénation catalytique du lien C=C capricieux en C-22, C-23 est bel bien possible et se réalise sur **33** avec un rendement global de 65%. La synthèse de **24** et des nombreux précurseurs préparés nous permettent tout de même de considérer l'objectif premier comme étant atteint.

## **PARTIE II : ÉVALUATION DU POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DES MOLÉCULES PRÉPARÉES**

## **CHAPITRE VI**

### **ÉVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DES BRASSINOSTÉROÏDES**

#### **6.1 Introduction**

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, le second objectif de ce travail de recherche consiste à l'évaluation de l'effet neuroprotecteur des brassinostéroïdes par rapport à la maladie de Parkinson. À cette fin, nous avons d'abord énuméré les causes présumées de cette neuropathologie en portant une attention particulière au stress oxydatif. Par la suite, nous avons discuté du fait que certains estrogènes possédant un fort potentiel anti oxydant étaient en mesure de contrer ce stress oxydatif et donc d'agir comme neuroprotecteur dans des conditions de surcharges oxydatives. Cependant, aux concentrations requises, des effets secondaires importants se manifestaient. C'est ainsi que nous avons tourné notre attention vers les brassinostéroïdes, des stéroïdes de plantes présents dans plusieurs végétaux du Québec. Nous avons aussi vu que la synthèse s'avère le meilleur moyen afin d'obtenir en quantité intéressante ces molécules particulières. Aux chapitres 3 à 5 nous avons présenté nos résultats pour la synthèse de plusieurs stéroïdes et de leur précurseurs. Dans ce chapitre, nous allons montrer notre stratégie pour l'évaluation de l'effet neuroprotecteur des brassinostéroïdes et nos résultats préliminaires in vitro obtenus. Tout d'abord nous verrons notre méthode choisie afin de reproduire la neurodégénérescence typique du Parkinson. Ensuite, nous aborderons le principe général de la méthodologie utilisée afin d'évaluer le potentiel neuroprotecteur des

molécules préparées aux chapitres 3 et 5. Nous terminerons finalement sur une brève discussion des résultats obtenus sur ces même molécules.

## 6.2 Le MPP<sup>+</sup>, un modèle toxicologique de la maladie de Parkinson

Dans le cadre de ce travail nous avons pu constater que la maladie de Parkinson n'est pas une pathologie simple à reproduire. En effet, elle n'est pas engendrée par une bactérie ni par un virus. De plus, elle implique la mort spécifique des neurones dopaminergiques du SNpc. Il faudra donc un moyen permettant d'engendrer spécifiquement la mort de ces neurones ainsi que les conséquences qui y sont rattachées (dommages cellulaires, stress oxydatif, voir chapitre 1). Heureusement plusieurs chercheurs se sont penchés sur ce problème et leurs recherches a permis l'élaboration de plusieurs modèles toxicologiques de la maladie de Parkinson. Ces modèles utilisent une toxine qui cause le plus possible les mêmes dommages spécifiques que la maladie de Parkinson et ce d'une manière la plus similaire possible à la maladie de Parkinson. Il existe présentement trois grands modèles toxicologiques de cette pathologie. Chacun de ces modèles utilise soit la toxine MPP<sup>+</sup>, soit la toxine 6-OHDA ou soit la toxine Paraquat afin d'imiter la neurodégénérescence du Parkinson<sup>(17)</sup>. Dans ce travail, nous n'aborderons que la toxine MPP<sup>+</sup> étant donné que c'est sur celle-ci que nos travaux de recherches se sont basés.

Dauer et Przedborski<sup>(17)</sup> résument très bien les propriétés et le mode d'action de cette toxine. Le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) fut d'abord étudié dans le début des années 80 chez les toxicomanes. Durant cette période, il fut observé que les consommateurs réguliers de la drogue MPPP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) développaient tous les symptômes de la maladie de Parkinson (tremblements involontaires, rigidité musculaire, etc). Un fait encore plus étonnant était que l'utilisation de L-DOPA permettait de diminuer les symptômes des

utilisateurs comme c'est le cas pour la maladie de Parkinson. Il fut par la suite démontré que ce n'était pas le MPPP qui était en cause mais l'un des produits secondaires qu'il contient soit le MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Markey<sup>(73)</sup> et son équipe ont par la suite montré que le MPTP est transformé en MPP<sup>+</sup>, la forme active de la neurotoxine dans l'organisme. Le MPTP traverse d'abord la barrière hémato encéphalique du cerveau pour se faire oxyder en plusieurs étapes dans les cellules gliales en MPP<sup>+</sup> selon plusieurs mécanismes complexes qui ne sont pas tous parfaitement compris. Après les travaux de Markey, il fut ensuite démontré que le MPP<sup>+</sup> cible spécifiquement les neurones dopaminergiques de la même manière que chez les personnes atteintes de la maladie de Parkinson<sup>(17)</sup>. Cette sélectivité remarquable observée provient principalement du fait que le MPP<sup>+</sup> possède une forte affinité pour le transporteur de la dopamine (DAT) ce qui lui permet facilement de passer la membrane cellulaire des neurones dopaminergiques. Une fois à l'intérieur de la neurone, le MPP<sup>+</sup> peut venir interagir avec plusieurs enzymes du cytosol et causer divers dommages cellulaires, mais son action la plus dangereuse se situe au niveau des mitochondries. Le MPP<sup>+</sup> étant chargé positivement, il vient ainsi séquestrer les électrons de la chaîne de transport d'électrons ce qui mène ultimement à l'impossibilité de produire de l'ATP. De plus, il fut aussi démontré qu'étant donné que le potentiel réducteur du système est diminué, le milieu cellulaire devient propice à la formation d'espèces oxygénés réactives conduisant éventuellement à la formation d'un stress oxydatif<sup>(17)</sup>. Dauer et Przedborski précise qu'un nombre d'études complexes ont montré les grandes similarités entre la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson et celle engendrée par la toxine MPP<sup>+</sup>. Même si ce modèle possède certaines limitations (notamment, le fait que presque l'intégralité des résultats expérimentaux sont basés sur le singe et la souris et non sur l'humain), il n'en demeure pas moins un des plus efficaces et un des plus utilisés.

À la lumière de cette discussion on peut maintenant comprendre notre intérêt pour cette toxine. La discussion précédente a permis de comprendre que le MPP<sup>+</sup> est une



neurotoxine qui entraîne spécifiquement la mort des neurones dopaminergiques par stress oxydatif. Aussi, le processus de mortalité cellulaire ainsi que les dommages causés suivent en grande partie ceux observés chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Cette toxine devrait ainsi être idéale dans l'évaluation du potentiel neuroprotecteur des brassinostéroïdes étant donné que l'on cherche à contrer le stress oxydatif responsable de la maladie. À la section suivante nous aborderons un bref aperçu de la méthode générale employée par nos collaborateurs pour mesurer cette propriété.

### 6.3 L'évaluation du potentiel neuroprotecteur des molécules préparées

À la section 6.2 nous avons résolu le problème à savoir comment induire une neurodégénérescence caractéristique de la maladie de Parkinson. Nous devons maintenant aborder la manière d'évaluer l'effet neuroprotecteur recherché. Tout d'abord, il est bon de rappeler que nos résultats préliminaires ont été effectués *in vitro*. Ceci implique donc que nous avons procédé à la culture de neurones dopaminergiques. Les cellules utilisées furent des cellules neuronales PC 12. Ces cellules cancéreuses des glandes surrénales de rats (non neuronales au départ) sont riches en dopamine et en noradrénaline ce qui leur permet de répondre au facteur de croissance du nerf (NGF) et d'éventuellement se différencier en neurones dopaminergiques<sup>(74)</sup>. Nous avons vu au premier chapitre que la maladie de Parkinson induit la mort cellulaire spécifiquement chez les neurones dopaminergiques. Aussi, à la section 6.2 nous avons pu constater que le MPP<sup>+</sup> provoque une neurodégénérescence similaire à celle de la maladie de Parkinson chez les mammifères. Ainsi, en traitant nos cellules neuronales PC 12 avec MPP<sup>+</sup> (disponible commercialement sous forme d'iodure) nous devrions nécessairement observer une certaine mortalité cellulaire. Si les brassinostéroïdes (et leurs précurseurs) préparés possèdent véritablement un effet neuroprotecteur, un prétraitement des cellules avec ceux-ci avant d'appliquer la toxine devrait minimiser

ou enrayer la mortalité cellulaire engendrée par la toxine. Comme nous l'avons vu auparavant, le MPP<sup>+</sup> détruit spécifiquement les neurones dopaminergiques par stress oxydatif, ainsi les résultats obtenus seront donc représentatifs par rapport à la maladie de Parkinson.

Afin d'évaluer la mortalité cellulaire engendrée par le MPP<sup>+</sup>, nous avons opté pour l'utilisation du test de cytotoxicité LDH. Celui-ci est basé sur l'enzyme lactate déshydrogénase qui est présente dans chacune de nos cellules étudiées. Lorsque les cellules sont endommagées par la toxine, celles-ci rejettent la LDH dans le milieu extracellulaire. Le kit de détection LDH permet de réaliser une séquence de réaction rédox avec la LDH qui mène ultimement à la réduction d'un sel de tetrazolium présent dans le kit en un dérivé de type formazan qui possède une coloration rouge. Ainsi, les mesures d'absorbance du milieu de culture seront témoins de la quantité de formazan formé qui est directement proportionnelle à la quantité de LDH expulsée par les cellules endommagées. Il est donc possible d'évaluer la mortalité cellulaire causée par la toxine de cette manière. En appliquant les règles statistiques appropriés il sera possible de déterminer si les brassinostéroïdes permettent «significativement» de protéger les neurones exposées à la toxicité du MPP<sup>+</sup> et donc de la maladie de Parkinson. La procédure générale employée par nos collaborateurs consiste à prétraiter les neurones avec les brassinostéroïdes pendant 3h puis d'appliquer la toxine et de laisser agir pendant 24h. Les tests de cytotoxicité sont ensuite réalisés pour évaluer le potentiel neuroprotecteur des brassinostéroïdes. La section suivante consistera en une brève discussion des résultats obtenus.

#### 6.4 Résultats obtenus pour le potentiel neuroprotecteur des molécules préparées

Le tableau 6.1, ainsi que la figure 6.1, montre les résultats obtenus lors de l'évaluation du potentiel des brassinostéroïdes préparées lors ce travail. À noter que les molécules **82** (24-épibrassinolide) et **83** (22 (*S*), 23 (*S*)-homobrassinolide) étaient disponibles commercialement et que **32** est notre produit de départ (stigmastérol).

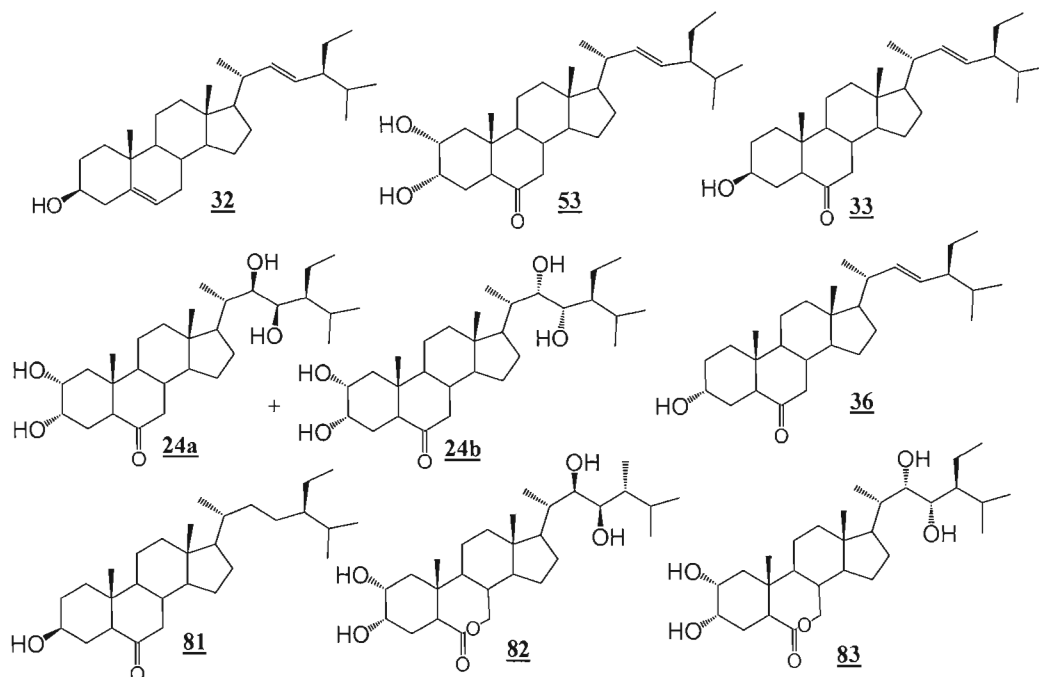
**Tableau 6.1**

Effet neuroprotecteur des brassinostéroïdes et de leurs précurseurs contre la toxicité du MPP<sup>+</sup> sur les PC12 neuronales.

Entrée	Brassinostéroïde ou précurseur <sup>b</sup>	Mortalité cellulaire, % du contrôle (Moyenne ± SEM)	
		10 <sup>-7</sup> M de brassinostéroïde	10 <sup>-9</sup> M de brassinostéroïde
1	<b>32</b>	10,2 ± 3,8 <sup>c</sup>	7,7 ± 2,8 <sup>c</sup>
2	<b>53</b>	10,5 ± 1,7 <sup>c</sup>	13,0 ± 1,5 <sup>c</sup>
3	<b>24</b>	3,0 ± 1,6 <sup>c</sup>	7,5 ± 1,9 <sup>c</sup>
4	<b>33</b>	6,8 ± 2,2 <sup>c</sup>	8,9 ± 2,9 <sup>c</sup>
5	<b>36</b>	9,0 ± 1,7 <sup>c</sup>	13,2 ± 1,6 <sup>c</sup>
6	<b>81</b>	1,2 ± 4,7 <sup>c</sup>	20,2 ± 4,2
7	<b>82</b>	5,5 ± 3,1 <sup>c</sup>	8,5 ± 2,4 <sup>c</sup>
8	<b>83</b>	21,2 ± 4,0	24,2 ± 3,6

[MPP<sup>+</sup> (5 mM) provoque 29,0 ± 4,4 % de mortalité cellulaire (moyenne ± SEM)<sup>a</sup>]

<sup>a</sup>p<0,001 vs la condition contrôle. One-way ANOVA, student-Newman-Keuls. <sup>b</sup>Les brassinostéroïdes/précurseurs ne présentent pas de toxicité sur les PC12 neuronales (résultats non présentés) <sup>c</sup>p<0,001 vs MPP<sup>+</sup> seul. One-way ANOVA, student-Newman-Keuls



**Figure 6.1** Structures des molécules dont le potentiel neuroprotecteur fut évalué au Tableau 2

Les résultats obtenus nécessitent évidemment une bonne discussion. Tout d'abord on observe que la toxine  $\text{MPP}^+$  a provoqué en moyenne une mortalité cellulaire de 29 % des cellules neuronales PC 12. À l'exception de **83** (21 à 24 %), toutes les autres molécules testées ont contré la toxicité du  $\text{MPP}^+$  de manière significative (**Tableau 6.1**, entrées 1 à 7). Étant donné les différentes structures des molécules testées, il est aussi possible de discuter des résultats obtenus selon les groupements présents et leur stéréochimie. Par exemple, les épimères **33** et **36** avec un alcool en C-3 possèdent tous les deux un potentiel neuroprotecteur similaire dans la limite des intervalles de confiance (6,8 vs 9,0 %, **Tableau 6.1** entrées 4 et 5). Ainsi, la stéréochimie en C-3 de l'alcool ( $\alpha$  chez **36** et  $\beta$  chez **33**) dans ces motifs ne semble pas affecter ce potentiel de manière significative. De plus, la présence d'un second alcool en position C-2 n'affecte pas non plus le potentiel de manière significative telle que montrée par le résultat obtenu pour le diol **53** (6,8 % pour **33** et

10,5 % pour **53**, **Tableau 6.1**, entrées 2 et 5). La situation est très différente pour les alcools en position C-22 et C-23. Si on prend par exemple les deux molécules commerciales **82** et **83**, on remarque que **82** possède un fort effet neuroprotecteur tandis que **83** semble inefficace à protéger les cellules contre la neurotoxine (**Tableau 6.1**, entrées 7 et 8). Or, dans le 24-épibrassinolide (**82**) les alcools en positions C-22, C-23 possèdent la stéréochimie 22 (*R*), 23 (*R*) alors que chez **83** ces alcools possèdent la stéréochimie 22 (*S*), 23 (*S*). On se rappellera qu'au chapitre 1 nous avons vu que tous les brassinostéroïdes naturels possèdent la fonction *cis* diol 22(*R*), 23(*R*). Ainsi même si **83** est disponible commercialement, celui-ci n'est pas un produit naturel. Il semblerait donc que l'isomère 22 (*R*), 23(*R*) possède bel et bien l'effet recherché tandis que son pendant 22 (*S*), 23 (*S*) est inactif par rapport à ce même effet. Ironiquement c'est le mélange d'isomères de la 28-homocastastérone (**24**) qui a montré le meilleur effet neuroprotecteur dans nos conditions (**Tableau 6.1**, entrée 3). À la lumière des résultats obtenus, il serait logique de penser que c'est l'isomère 22(*R*), 23(*R*) qui contribue au potentiel neuroprotecteur, mais on ne peut être certain pour le moment. Il faudrait soit préparer d'autres isomères possédant la configuration 22(*S*), 23(*S*) ou réussir à séparer le mélange d'isomères. Quoi qu'il en soit, ce résultat permet à tout le moins d'affirmer que la fonctionnalité 7-oxolactone présent chez **82** ne semble pas être un élément clef pour contrer la toxicité du MPP<sup>+</sup> étant donné que le mélange **24** ne possède qu'une cétone cyclique à 6 membres (5,5 % pour **82** et 3,0 % pour **24**, **Tableau 6.1** entrées 3 et 7). Ce résultat est intéressant car au chapitre 1 nous avons pu constater que seuls les brassinostéroïdes possédant la fonctionnalité 7-oxolactone possédaient une activité importante chez les plantes. Ajoutons aussi que le stigmastérol (**32**) possède lui aussi un effet neuroprotecteur. Ce résultat n'est pas si surprenant car il est bon de mentionner que le stigmastérol est présent naturellement chez les plantes (le stigmastérol commerciale de chez Acros Organics est directement extrait de sources végétales). Un autre fait important est que plusieurs précurseurs testés ne possédaient pas la fonction *cis* diol en C-22, C-23, mais plutôt un lien double C=C. À ce stade-ci, il est impossible d'affirmer si ce lien alcénique contribue à l'effet désiré. Il se pourrait qu'à l'intérieur des neurones dopaminergiques une transformation

chimique se produit sur cette insaturation et que l'effet observé provienne de cette transformation. À cette fin nous avons décidé d'évaluer le potentiel neuroprotecteur de **81** le dérivé avec un alcool en C-3 dont le lien alcénique en C-22, C-23 fut hydrogéné. Les résultats obtenus oscillent grandement entre les deux concentrations témoins utilisées (**Tableau 6.1**, entrée 6). Il est possible que l'augmentation du degré de liberté de la chaîne alkyle puisse empêcher totalement la neuroprotection de se produire à  $10^{-9}$ M. Pourtant, lorsque l'on concentre 100X plus la solution de brassinostéroïde, on observe un effet de protection similaire aux autres molécules testés. Il n'est pas simple de trouver une explication de ce résultat. Afin d'obtenir une tendance acceptable il faudrait préparer encore une fois d'autres dérivés hydrogénés. Cependant, à première vue, l'hydrogénation du lien C-22, C-23 semble perturber grandement le potentiel neuroprotecteur des molécules étudiées. En préparant encore plus de dérivés et plus de brassinostéroïdes nous devrions être en mesure de construire un modèle RSA valable du potentiel neuroprotecteur des molécules vis-à-vis de la toxicité du MPP<sup>+</sup>. À noter que même si nous avons préparé le dérivé décarbonylé **34** nous n'avons pas encore procédé à l'évaluation de son activité biologique étant donné que son obtention est récente et que la pureté du composé laisse présentement à désirer.

En résumé, les brassinostéroïdes et leurs précurseurs semblent effectivement posséder un effet neuroprotecteur sur les neurones dopaminergiques lorsque celles-ci sont soumises au stress oxydatif causé par la toxine MPP<sup>+</sup>. Étant donné que le MPP<sup>+</sup> est un modèle reconnu de la maladie de Parkinson, on peut penser que les molécules préparées pourraient s'avérer utiles dans le combat contre le Parkinson. Les résultats intéressants in vitro obtenus nous permettront de passer au stade in vivo sous peu. Il est maintenant temps de faire une conclusion générale de la seconde partie de ce travail.

## 6.5 Conclusions

Le second objectif de ce travail consistait en l'évaluation du potentiel neuroprotecteur des brassinostéroïdes. Plus particulièrement, on désirait déterminer si les brassinostéroïdes étaient efficaces pour prévenir la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson. Pour ce faire nous avons préparé plusieurs brassinostéroïdes ainsi que leurs précurseurs aux chapitres 3 et 5. Afin d'évaluer l'activité recherchée, nous avons utilisé un modèle toxicologique de la maladie de Parkinson utilisant la toxine MPP<sup>+</sup>. La grande majorité des précurseurs et brassinostéroïdes testés ont réussi à protéger nos cellules neuronales PC 12 différenciées en neurones dopaminergiques contre le stress oxydatif causé par le MPP<sup>+</sup>. Globalement nous avons montré que la stéréochimie des alcools en position C-22,C-23 semble cruciale dans l'expression du potentiel neuroprotecteur recherché. Ainsi, nos résultats préliminaires montrent qu'un brassinostéroïde possédant des alcools avec la stéréochimie 22(*R*), 23(*R*) affichent bel et bien un effet neuroprotecteur dans nos conditions alors que ce n'est pas le cas pour son isomère 22 (*S*), 23 (*S*). De plus, la présence de la fonctionnalité 7-oxolactone n'est pas essentielle pour que le stéroïde en question possède l'activité biologique tant convoitée. Ce résultat fait contraste avec l'activité des brassinostéroïdes chez les plantes où la présence de cette fonction est requise afin d'obtenir les effets désirés. Plusieurs autres molécules sont nécessaires afin d'obtenir une meilleure évaluation de l'effet neuroprotecteur des brassinostéroïdes ainsi qu'un modèle RSA plus efficace. Étant donné que le MPP<sup>+</sup> reproduit le plus possible la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson, on peut espérer que les résultats obtenus soient applicable à la maladie de Parkinson. Des études in vivo nous permettront éventuellement de confirmer si ces molécules pourront s'avérer utiles chez les mammifères. On peut finalement conclure en affirmant que nos résultats préliminaires semblent bien confirmer notre hypothèse de départ à savoir que les brassinostéroïdes affichent bel et bien un potentiel neuroprotecteur dans des conditions de surcharges oxydatives.

## CHAPITRE VII

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Le premier objectif de ce travail de recherche consistait à préparer plusieurs brassinostéroïdes se retrouvant dans la flore québécoise. Au chapitre 3, nous avons réalisé la synthèse de la 28-homocastastérone (20% en 5 étapes) à partir du stigmastérol (32). Malheureusement celle-ci fut obtenue avec son isomère 22 (*S*), 23 (*S*) non désiré. La séparation des deux isomères obtenus fut impossible par chromatographie éclair. Nos dérivatisations réalisées (diacétonide 48, tétraacétate 49) n'ont pas permis la séparation de ce mélange d'isomères. Nous avons donc mis au point un plan alternatif de synthèse basé sur l'insertion d'un nucléophile de manière stéréosélective sur l'aldéhyde 52 afin d'obtenir seulement l'isomère désiré de 24. Pour générer cet aldéhyde nous avons opté pour un clivage oxydatif de la fonction *cis* diol en C-22, C-23. À cette fin, au chapitre 4, nous avons préparé plusieurs précurseurs de différents brassinostéroïdes tant synthétiques que naturels. Ces précurseurs «alcènes» ne nécessitent plus qu'une dihydroxylation du lien C-22, C-23 afin d'être en mesure de réaliser le clivage oxydatif désiré. Les rendements obtenus pour les synthèses des précurseurs alcéniques furent de 24% (5 étapes) pour 53, 39 % (5 étapes) pour 33, 19% pour 36 (7 étapes) et 12 % (7 étapes) pour 34. Au chapitre 5, nous avons vu que les tentatives de dihydroxylation de ces précurseurs avec OsO<sub>4</sub> et RuO<sub>4</sub> ont échouées. Il semblerait que la dihydroxylation ne fonctionne guère lorsque les précurseurs possèdent seulement un lien C=C en C-22, C-23 (contrairement au diène 27 (lien en C-2, C-3 et C-22, C-23) utilisé dans la synthèse de la 28-homocastastérone (24)). Dans ce même chapitre, nous avons



aussi émis l'hypothèse que l'hydrolyse difficile de l'ester d'osmium (intermédiaire lors de la dihydroxylation) formé sur ce lien alcénique est la cause de la faible réactivité observée lors de ces dihydroxylations. Nous avons par la suite tenté de générer un époxyde en C-22, C-23 que l'on pourrait ouvrir afin de générer le diol désiré. Nous avons éventuellement été en mesure de préparer l'époxyde **80** (10% de rendement, 8 étapes) en utilisant un groupement TBDMS en position C-3 et un groupement acétal en position C-6. Toutefois, nos résultats préliminaires montrent que cette ouverture n'est pas simple à réaliser (2 tentatives infructueuses). Lors des travaux futurs, il faudra soit tenter une nouvelle approche pour ouvrir cet époxyde ou soit réaliser l'ozonolyse du lien C=C en C-22, C-23 des précurseurs obtenus au chapitre 4 afin d'obtenir les aldéhydes cibles. Même si nous n'avons pas été en mesure de réaliser la synthèse de plusieurs brassinostéroïdes, nous considérons tout de même avoir réalisé un travail satisfaisant étant donné que ce projet de recherche a débuté au laboratoire avec ce présent travail et que les résultats obtenus serviront dans les projets futurs. Le second objectif de ce travail de recherche consistait à l'évaluation de l'effet neuroprotecteur des molécules préparées. Au chapitre 6, nous avons vu que nos molécules préparées (ainsi que 2 brassinostéroïdes commerciaux) sont aptes à contrer le stress oxydatif causé par le MPP<sup>+</sup> (in vitro), une toxine reproduisant la neurodégénérescence caractéristique de la maladie de Parkinson. Dans ce même chapitre nous avons aussi débuté l'élaboration d'un modèle RSA sur cet effet neuroprotecteur. Cependant, afin d'être valable ce modèle nécessite un plus grand nombre de résultats. Pour conclure, mentionnons que même si à première vue les brassinostéroïdes semblent effectivement posséder un effet neuroprotecteur dans nos conditions expérimentales, il faudra toutefois réaliser une étude in vivo afin de savoir réellement si les brassinostéroïdes sont aptes à prévenir la maladie de Parkinson.

## **PARTIE III : MÉTHODOLOGIE**

## CHAPITRE VIII

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### 8.1 Remarques générales

Les solvants utilisés furent fournis par la compagnie Fischer et sous la certification ACS et distillés avant leur utilisation. Lorsqu'une réaction a nécessité l'utilisation d'un solvant anhydre, celui-ci fut asséché selon les méthodes usuelles (distillation sur sodium,  $P_2O_5$ ). Lorsque les protocoles mentionnent l'utilisation de conditions anhydres, ceci implique le séchage à l'étuve de la verrerie, des aiguilles et des agitateurs à 50°C pendant 24h. Les réactions furent suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de silices déposées sur aluminium de la compagnie Silicycle (250  $\mu\text{m}$ ). Les plaques CCM furent développées avec une solution acide de molybdate d'ammonium (PMA). Les chromatographies éclaircies furent réalisées avec la silice Siliaflash P60 de la compagnie Silicycle (40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh). Le stigmasterol (**32**) (utilisé comme produit de départ) fut acheté de la compagnie Acros Organics (95 % pur).

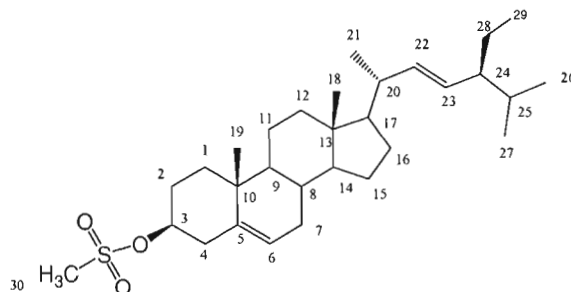
Les spectres de masses à basse résolution (SMBR) furent enregistrés sur un système CPG-SM de la compagnie Agilent Technologies (système CPG 6890 N et détecteur sélectif de masse 5973) en utilisant l'hélium comme gaz porteur. Les spectres de masses à haute résolution (SMHR) ont été enregistrés à l'UQAM sur un système CLHP 1200 en utilisant un détecteur TOF 6210 de la compagnie Agilent Technologies. Les spectres RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) 200 MHz furent enregistrés sur un

spectromètre de la compagnie Varian. Pour la molécule **55** les spectres RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et NOESY) à 600 MHz furent enregistrés à l'UQAM sur un appareil de la compagnie Varian. Tous les spectres RMN ont été enregistrés dans du  $\text{CDCl}_3$  contenant 0,2% de  $\text{CHCl}_3$  comme référence interne. Les données spectrales RMN sont présentées en déplacement chimique en ppm ( $\delta$ , ppm). Les spectres IR ont été obtenus sur un spectromètre Impact 420 de Nicolet. Tous les IR ont été obtenus en mélangeant les molécules à l'étude dans du KBr anhydre et en formant une pastille avec ce mélange. Les points de fusion furent évalués sur un appareil de la compagnie Electrothermal et ne sont pas corrigés. Si les solides obtenus furent recristallisés avant la mesure de leur point de fusion, le solvant de recristallisation est spécifié entre parenthèse avant la valeur du point de fusion.

Nous présentons l'ensemble complet des données spectrales (et point de fusion) seulement pour les molécules que nous considérons comme « finales », c'est-à-dire celles dont nous avons évalué le potentiel neuroprotecteur. La seule exception à cette règle est le mélange d'isomères de la 28-homocastastérone (IR en panne et impossible à volatiliser au CPG-SM, manque  $T_{\text{fus}}$ ) car nous avons eu beaucoup de problème à le préparer de nouveau (ainsi que **72** à cause des problèmes avec notre méthode de dihydroxylation). Cependant nous avons comparé les spectres RMN obtenus avec les références pour confirmer la structure des isomères (voir chapitre 3). Les spectres de masses furent fournis pour les molécules volatilisables dans notre CPG-SM (les molécules finales non volatilisables auront toutefois les SMHR). Notre seule spectromètre IR fut en panne pendant une bonne partie du projet et pour cette raison certaines molécules non vitales (voies de synthèses abandonnées, dérivatisations) ne possèdent pas de spectre IR.

## 8.2 Préparation des molécules présentées au chapitre III

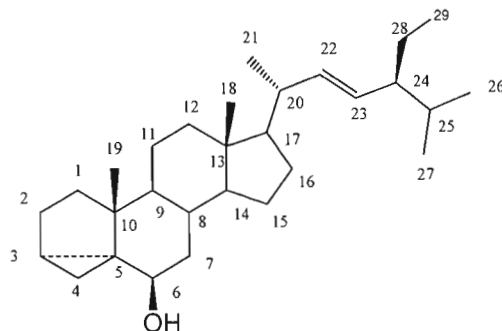
### 8.2.1 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3β-(méthylsulfonyloxy)-stigmasta-5,22-diene (**47**)



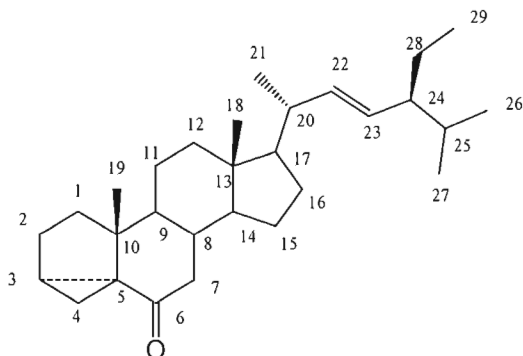
Sous atmosphère de N<sub>2</sub> et en condition anhydre, 5,25 g (12,1 mmol, 1,00 éq) de stigmastérol (**32**) 95% sont dissous dans 60 mL de toluène. À cette solution est ajouté 13,0 mL (93,1 mmol, 7,70 éq) de triéthylamine à l'aide d'une seringue. La solution est refroidie à 0°C avec un bain de glace et 2,8 mL (36,3 mmol, 3,00 éq) de chlorure de méthanesulfonyle est ajouté goutte à goutte pendant 10 minutes. Le mélange résultant est agité à 0°C pendant 1h30. La solution jaune obtenue est diluée à l'eau puis extraite au toluène (x 3). La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau (x 3), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique est ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. L'évaporation sous vide nous a permis d'obtenir 5,84 g de **47** (97%) sous la forme d'un solide cristallin blanc *T*<sub>fus</sub> (Hexane/Acétone) 115-117°C.

**RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,43 (m, 1H, H-6), 5,14 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 8 Hz, J<sub>2</sub>= 15 Hz, H-22), 5,06 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 8 Hz, J<sub>2</sub>= 15 Hz, H-23), 4,53 (m, 1H, H-3α), 3,00 (s, 3H, H-30), 2,48 (m, 2H), 2,10-1,10 (m, 23H), 1,03 (s, 3H, H-19), 1,02 (d, 3H, J= 6 Hz, H-21), 0,90-0,78 (m, 9H), 0,69 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 138,8 (C-5), 138,5 (C-22), 129,6 (C-23), 124,0 (C-6), 82,3 (C-3), 56,9, 56,2, 51,5, 50,2, 42,4, 40,7, 39,8, 39,4, 39,0, 37,1, 36,6, 32,1, 32,0, 29,2, 29,1, 25,6, 24,6, 21,5, 21,3, 21,2, 19,4, 19,2, 12,5, 12,3. **IR** (pastille de KBr, ν (cm<sup>-1</sup>)) 2965, 2872, 1462, 1309, 1173, 950, 873. **SMBR** (*m/z*, intensité relative) 395 (M-Ms)<sup>+</sup> (100), 394 (30), 351 (15), 255 (40).

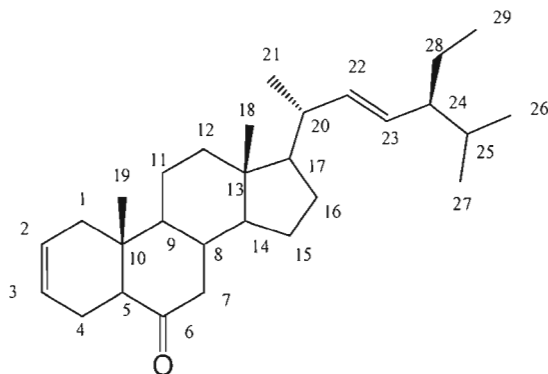
### 8.2.2 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol (**31**)



5,40 g (11,0 mmol, 1,00 éq) du mésylate **47** sont suspendus dans une solution constituée de 80 mL H<sub>2</sub>O et de 240 mL d'acétone. À cette solution est ajouté 1,32 g de KHCO<sub>3</sub> (13,2 mmol, 1,20 éq). La suspension est chauffée à reflux pendant 4h. La solution est refroidie à température ambiante puis extraite avec de l'EtOAc (x 3). La phase organique est lavée à l'eau (x 3), lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique est ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. L'évaporation sous vide a permis d'obtenir 5,79 g de **31** sous forme d'une huile jaune. Ce produit brut fut purifié par chromatographie éclair en éluant avec un mélange Hexane/Éther (1 : 1). On obtient 3,40 g de **31** (75%) pur sous forme d'un semi-solide incolore. À noter que l'on peut éviter cette purification et ne purifier qu'au stade suivant (c'est ce que nous faisons en général). **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 5,13 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,06 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 3,24 (m, 1H, H-6 $\alpha$ ), 2,15-1,10 (m, 23H), 1,05 (s, 3H, H-19), 1,03 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, H-21), 0,98-0,78 (m, 10H), 0,73 (s, 3H, H-18), 0,51 (m, 2H, H-4), 0,31 (m, 1H, H-3). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 138,6 (C-22), 129,5 (C-23), 74,0 (C-3), 56,8, 56,3, 51,5, 47,9, 43,1, 42,8, 40,8, 40,3, 39,1, 37,4, 33,4, 32,1, 30,1, 29,2, 25,6, 25,2, 24,5, 24,4, 22,9, 21,5, 21,3, 20,4, 19,2, 12,6, 12,5, 11,8. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 3471, 2970, 2867, 1478, 1369, 1293, 1009, 960. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 412 (M<sup>+</sup>) (20), 394 (90), 351 (40), 255 (100).

8.2.3 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one (**28**)

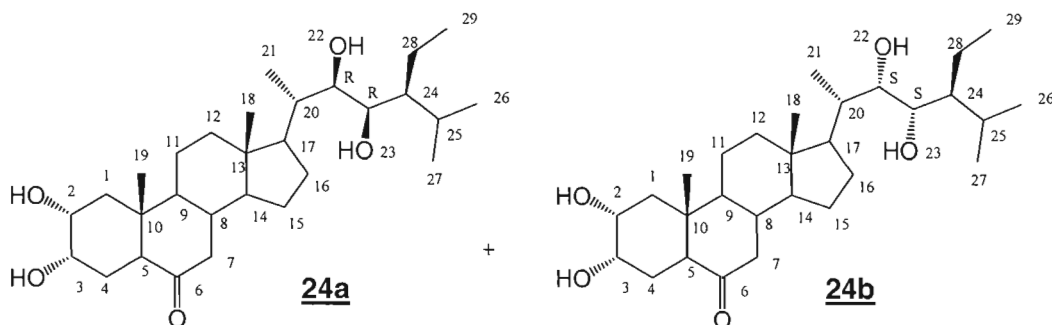
3,30 g (7,99 mmol, 1,00 éq) de l'alcool (**31**) sont dissous dans 80 mL d'acétone. La solution est vigoureusement agitée puis la température de la solution est abaissée à 0°C avec un bain de glace. Le réactif de Jones est ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que la coloration rouge de la solution persiste (env 3,1 mL). La solution est ensuite agitée à 0°C pendant 5 min. Le mélange obtenu est ensuite concentré sous vide. Le résidu vert obtenu est dilué à l'eau et extrait avec de l'EtOAc (x 3). La phase organique est lavée avec de l'eau (x 3), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique est ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide, on obtient 2,82 g de **28** sous la forme d'un solide jaune pâle. Ce produit brut est purifié par chromatographie sur colonne et l'élution avec un gradient Benzène/EtOAc (0 → 6%) a permis d'obtenir 2,30 g de **28** (78%) pur sous la forme de plaques blanches. **T<sub>fus</sub>** (EtOH) 95-97°C. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 5,16 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,08 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 2,42 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 14$  Hz, H-7 $\alpha$ ), 2,10- 1,10 (m, 25H) 1,03 (s, 3H, H-19), 1,02 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, H-21), 0,98-0,78 (m, 9H), 0,73 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 210,1 (C-6), 138,3 (C-22), 129,7 (C-23), 57,7, 56,1, 51,5, 47,0, 46,5, 46,3, 45,0, 42,8, 40,7, 39,8, 35,6, 35,0, 33,7, 32,1, 29,1, 26,1, 25,6, 24,4, 23,1, 21,4, 21,3, 19,9, 19,2, 12,5, 12,4, 11,9. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 2943, 2856, 1685, 1478, 1369, 1298, 1167, 966, 922. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 410 (M<sup>+</sup>) (100), 392 (10), 367 (70), 298 (70), 271 (75).

8.2.4 Préparation du (22*E*, 24*S*)-stigmasta-2,22-dien-6-one (**27**)

1,00 g de la cétone pentacyclique **28** (2,44 mmol, 1,0 éq) est ajouté à 10 mL de DMA. À cette suspension est ajouté 0,14 g de LiBr (1,22 mmol, 0,50 éq) et 0,11 g de Py-HCl (1,22 mmol, 0,50 éq). Ce mélange est porté à reflux sous atmosphère de N<sub>2</sub> pendant 3h30. La solution est ensuite refroidie à température pièce puis à 0°C avec un bain de glace. Un solide blanc précipite alors dans la solution orangée. Le solide est filtré sous vide et lavé avec du MeOH glacé (x 3). Le filtrat obtenu est ensuite dilué à l'eau et extrait à l'hexanes (x 4), lavé avec une solution saturée de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (x 2) puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique est ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. On obtient un solide orangé que l'on combine au solide blanc obtenu précédemment afin d'obtenir 980 mg de **27** brut. Le mélange de solide obtenu est purifié par chromatographie éclair et l'élution avec du Benzène a mené à l'obtention de 700 mg de **28** (70%) pur sous la forme d'un solide poudreux blanc. **T<sub>fus</sub>** (EtOH) 111-112°C. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,66-5,58 (m, 2H, H-2 et H-3) 5,13 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 8 Hz, J<sub>2</sub>= 15 Hz, H-22), 5,07 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 8 Hz, J<sub>2</sub>= 15 Hz, H-23), 2,40-1,20 (m, 26 H), 1,04 (d, 1H, J= 7 Hz, H-21), 1,02-0,80 (m, 9H), 0,71 (s, 3H, H-19), 0,69 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 212,4 (C-6), 138,3 (C-22), 129,8 (C-23), 125,2 et 124,8 (C-2 et C-3), 57,1, 56,1, 54,1, 53,7, 51,5, 47,3, 42,9, 40,7, 40,3, 39,6, 37,9, 32,1, 29,0, 25,6, 24,2, 22,0, 21,4, 21,3, 19,2, 13,7, 12,5, 12,4. **IR** (pastille de KBr, ν (cm<sup>-1</sup>)) 2961, 2863, 1710, 1460, 1389, 965. **SMBR** (*m/z*, intensité relative) 410 (M<sup>+</sup>) (100), 395 (80), 367 (25), 297 (25), 269 (30).

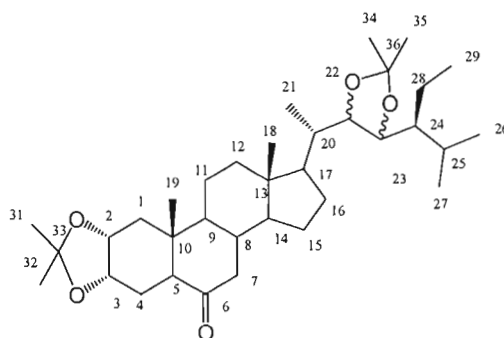


8.2.5 Préparation du (22*R*, 23*R*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmasteran-6-one (**24a**) et son isomère 22(*S*), 23(*S*) (**24b**)



0,62 g du diène **27** (1,52 mmol, 1,00 éq) est dissous dans 30 mL de *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O 1:1. À cette solution on ajoute 1,26 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,10 mmol, 6,00 éq), 3,00 g de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (9,10 mmol, 6,00 éq), 0,14 g de DHQ (0,30 mmol, 0,20 éq), 0,29 g de méthanesulfonamide (3,00 mmol, 2,00 éq) et 0,60 mL d'une solution de OsO<sub>4</sub> 2,5 % dans *t*-BuOH (0,06 mmol, 0,04 éq). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 6 jours. On ajoute ensuite 1,20 g de NaHSO<sub>3</sub> et on laisse réagir 18h à température ambiante. Le mélange obtenu est dilué à l'eau et extrait à l'EtOAc (x 6). La phase organique est lavée avec une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M (x 3) et avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 3). La phase organique est ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. On obtient 610 mg de **24** sous la forme d'un solide jaune. Ce produit brut est purifié par chromatographie sur colonne en utilisant un gradient CHCl<sub>3</sub>/EtOH (0 → 2%). On obtient 329 mg de **24** (mélange d'isomère 1 : 1) sous la forme d'un solide blanc. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4,04 (m, 1H, H-3β), 3,64 (m, 1H, H-2β), 3,52 (m, 2H, H-22 et H-23), 2,62 (dd, 1H, H-5, J<sub>1</sub>= 13 Hz, J<sub>2</sub>= 3 Hz), 2,30-1,10 (m, 30H), 1,02-0,82 (m, 9H), 0,76 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 212,1 (C-6 **24a**), 210,7 (C-6 **24b**), 72,4 (C-23*R*), 72,0 (C-22*R*), 70,9 et 70,8 (C-22*S* et C-23*S*) 69,3 et 69,2 (C-2 et C-3 **24b**), 68,6 et 68,5 (C-2 et C-3 **24a**), 57,4, 56,5, 54,9, 53,9, 52,9, 52,8, 50,9 49,8, 46,9, 46,6, 43,8, 43,7, 42,8, 42,6, 42,5, 40,8, 40,4, 39,7, 39,6, 37,4, 28,0, 27,1, 26,5, 24,4, 22,0, 21,8, 21,4, 18,8, 17,9, 15,4, 14,7, 14,4, 13,8, 12,2, 12,1.

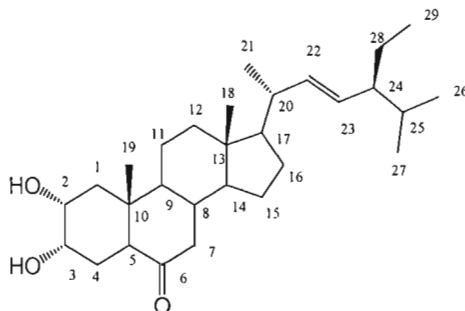
### 8.2.6 Préparation du (24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3,22,23-diacétonide (**48**)



70 mg (0,13 mmol, 1,00 éq) du mélange d'isomères de **24** est suspendu dans 1,5 mL de CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 : 1. À cette suspension est ajouté 0,20 mL de DMP (1,50 mmol, 12,0 éq) et 1 mg de CSA (cat). La solution incolore résultante est agitée à température ambiante pendant 1h. La solution obtenue est diluée au dichlorométhane et lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2) puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). On obtient 78 mg d'un solide jaune pâle. Ce solide est purifié par chromatographie éclair et l'élution avec du chloroforme à fournit 63 mg de **48** (92%) sous la forme d'un solide amorphe blanc. Mélange d'isomères en C-22, C-23. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 4,32-3,78 (m, 4H, H-2, H-3, H-22, H-23), 2,52 (dd, 1H,  $J_1 = 11$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz, H-5), 2,40-0,80 ppm (47, XH), 0,72-0,67 (m, 6H, H-18 et H-19). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 211,7 et 210,2 (C-6), 108,3 et 108,1 et 106,9 (C-33, C-36), [80,0, 79,9, 74,8, 73,4, 72,5, 72,37 (C-2, C-3, C-22, C-23)], 56,6, 55,0, 54,8, 53,5, 53,0, 51,7, 47,0, 46,9, 46,8, 43,8, 43,7, 42,6, 41,4, 40,4, 39,7, 39,6, 39,3, 38,6, 37,7, 37,4, 29,9, 28,8, 28,3, 27,7, 27,5, 27,0, 26,7, 26,4, 24,8, 24,4, 23,6, 22,8, 21,5, 21,3, 19,8, 18,8, 14,8, 14,3, 13,5, 12,9, 11,8, 11,7.

### 8.3 Préparation des molécules présentées au chapitre IV

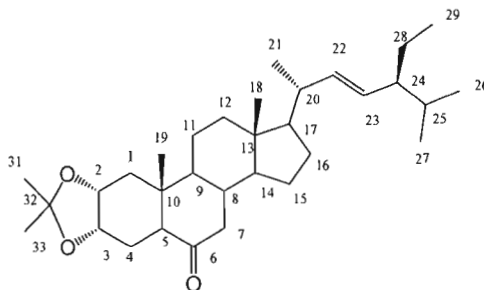
#### 8.3.1 Préparation du (22*E*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**53**)



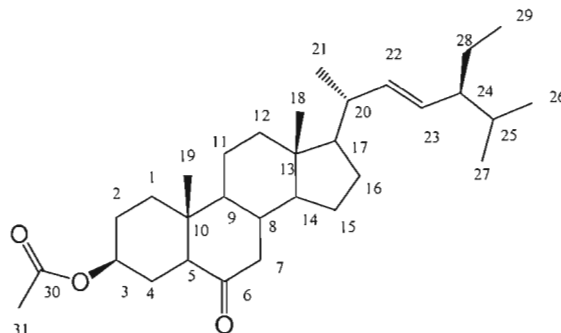
250 mg (0,61 mmol, 1,00 éq) du diène **27** est suspendu dans 7,5 mL d'un mélange acétone/eau 9 : 1 . À ce mélange est ajouté 0,18 g de NMO (1,52 mmol, 2,50 éq) et la suspension obtenue est agitée à température ambiante pendant 12 h. On ajoute ensuite un excès de NaHSO<sub>3</sub> (0,15 g dans 2,5 mL d'eau) à la solution jaune obtenue et on agite à température ambiante pendant 5 h. Le mélange obtenu est dilué à l'eau et on procède ensuite à l'extraction avec EtOAc (x 3). La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau (x 3), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique est ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on obtient 217 mg d'un solide brun clair. Ce solide est purifié d'abord par chromatographie éclair en éluant avec un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2% puis est ensuite recristallisé dans l'EtOH. On obtient 160 mg de **53** (60%) sous la forme d'aiguilles blanches. *T*<sub>fus</sub> (EtOH) 237-239°C. **RMN** <sup>1</sup>**H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 5,13 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8 Hz, *J*<sub>2</sub>= 15 Hz, H-22), 5,07 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8 Hz, *J*<sub>2</sub>= 15 Hz, H-23), 4,04 (m, 1H, H-3 $\beta$ ), 3,75 (m, 1H, H-2 $\beta$ ), 2,65 (dd, 1H, H-5, *J*<sub>1</sub>=13 Hz, *J*<sub>2</sub>= 3 Hz), 2,31 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>=13 Hz, *J*<sub>2</sub>= 4 Hz), 2,20-1,10 (m, 24H), 1,03, (d, 3H H-21, *J*= 6 Hz), 0,74-0,86 (m, 9H), 0,75 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN** <sup>13</sup>**C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 212,3 (C-6), 138,2 (C-22), 129,9 (C-23), 68,6 et 68,5 (C-2, C-3), 57,0, 56,1, 54,0, 51,5, 50,9, 47,0, 43,1, 42,8, 40,6, 40,5, 39,6, 37,9, 32,1, 28,9, 26,5, 25,6, 24,2 21,4, 21,3, 19,2, 13,8, 12,5. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 3384, 2954, 2856, 1712, 1451, 1374, 1048, 966. **SMBR**

( $m/z$ , intensité relative) (dérivé OTMS **53b**) 573 ( $M-CH_3$ )<sup>+</sup> (30), 498 (15), 471 (100), 382 (30). **SMHR** calculée pour  $C_{29}H_{48}O_3$  (445, 3679  $M+H^+$ ), trouvée (445, 3676  $M+H^+$ ).

### 8.3.2 Préparation du (22*E*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmasteran-6-one 2,3-acétonide (**54**)



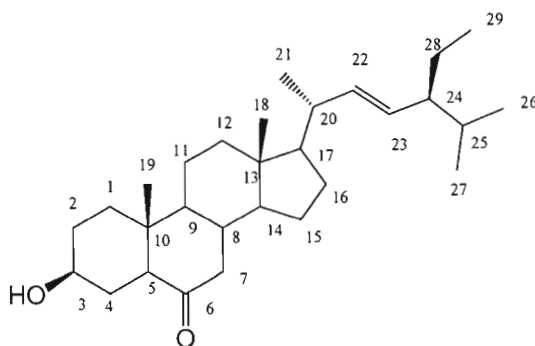
150 mg (0,33 mmol, 1,00 éq) du diol **53** est suspendu dans 3,0 mL de  $CH_3CN/CH_2Cl_2$  1 : 1. À cette suspension est ajouté 0,50 mL de DMP (4,10 mmol, 12,4 éq) et 2,5 mg de CSA (cat). La solution incolore résultante est agitée à température ambiante pendant 1h. La solution obtenue est diluée au dichlorométhane et lavée avec une solution aqueuse saturée de  $NaHCO_3$  (x 2) puis avec une solution aqueuse saturée de  $NaCl$  (x 2). On obtient 162 mg d'un solide jaune pâle. Ce solide est purifié par chromatographie éclair et l'élution avec un mélange  $CH_2Cl_2/EtOAc$  (95:5) a fourni 150 mg de **54** (92%) sous la forme d'un solide blanc. **RMN  $^1H$**  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,16 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,06 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 4,27 (m, 1H, H-3), 4,06 (m, 1H, H-2), 2,51 (dd, 1H, H-5,  $J_1 = 13$  Hz, 3 Hz), 2,26 (dd, 1H,  $J_1 = 13$  Hz,  $J_2 = 4$  Hz), 2,10-1,42 (m, 22H), 1,49 (s, 3H, H-31 ou H-33), 1,33 (s, 3H, H-31 ou H-33), 1,03 (d, 3H, H-21,  $J = 6$  Hz), 0,77-0,88 (m, 9H), 0,67-0,69 (m, 6H, H-18 et H-19). **RMN  $^{13}C$**  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 211,7 (C-6), 138,8 (C-22), 129,8 (C-23), 108,1 (C-32), 72,6 et 72,4 (C-2 et C-3), 57,0, 56,1, 53,6, 51,7, 51,5, 47,1, 43,0, 42,7, 41,4, 40,6, 39,5, 37,8, 32,1, 28,9, 28,8, 26,7, 25,6, 24,3, 22,8, 21,4, 21,3(2), 19,2, 12,9, 12,5, 12,4. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $cm^{-1}$ )) 2970, 2860, 1702, 1469, 1382, 1242, 1218, 1063, 962.

8.3.3 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3β-acétoxy-5α-stigmastan-22-en-6-one (**55**)

1,80 g (4,38 mmol, 1,00 éq) de la cétone pentacyclique **28** est ajouté dans 90 mL d'acide acétique concentré. La solution est agitée jusqu'à dissolution complète du solide, puis 8,8 mL d'une solution aqueuse 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y est ajouté. La solution trouble est ensuite portée à reflux pendant 2h. La solution est ensuite refroidie puis la solution est diluée à l'eau et extraite à l'EtOAc (x 4). La phase organique est lavée à l'eau (x 6) puis avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2) et avec une solution saturée de NaCl (x 2). La phase organique est évaporée sous vide et le résidu jaune obtenu est dissous dans 20 mL de pyridine. On ajoute à cette nouvelle solution 1,85 mL d'anhydride acétique et 18 mg de DMAP. Cette solution est agitée à température ambiante pendant 3h. Le mélange orangé obtenu est dilué à l'eau puis extrait à l'EtOAc (x 4). La phase organique est lavée à l'eau (x 3), avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2) et avec une solution saturée de NaCl (x 2) puis séchée avec MgSO<sub>4</sub>. L'évaporation sous vide nous donne 1,56 g de **55** (74%) sous la forme d'un solide blanc cristallin. *T*<sub>fus</sub> 142-144°C. **RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,13 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8 Hz, *J*<sub>2</sub>= 15 Hz, H-22), 5,03 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8 Hz, *J*<sub>2</sub>= 15 Hz, H-23), 4,66 (m, 1H, H-3α), 2,31 (dd, 1H, H-5 *J*<sub>1</sub>= 5 Hz, *J*<sub>2</sub>= 13 Hz), 2,25 (dd, 1H, H-7, *J*<sub>1</sub>= 3 Hz, *J*<sub>2</sub>= 13 Hz), 2,02 (s, 3H, H-31), 2,03-1,10 (m, 27 H), 1,01 (d, 3H, H-21, *J*= 6 Hz), 0,80 (t, 3H, H-29, *J*= 7 Hz), 0,78 (d, *J*= 7 Hz, 3H), 0,77 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 211,2 (C-6), 170,6 (C-30), 137,9 (C-22), 129,6 (C-23), 72,8 (C-3), 56,8, 56,5, 55,9, 51,2, 46,6, 42,8, 40,9, 40,4, 39,3, 37,9, 36,4, 31,8, 28,7, 26,8, 26,1, 25,4, 24,0, 21,4, 21,3, 21,1(2), 19,0, 13,0, 12,2 (2). **NOESY**

$^1\text{H}$  (H-5 2,31 $\alpha$  H-3, 4,66). **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 2941, 2876, 1741, 1708, 1478, 1361, 1244, 1023, 960. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 470 ( $\text{M}^+$ ) (70), 410 (60), 367 (80), 329 (100), 271 (95). **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$  (493,3653 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ), trouvée (493,3652 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ )

#### 8.3.4 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**33**)

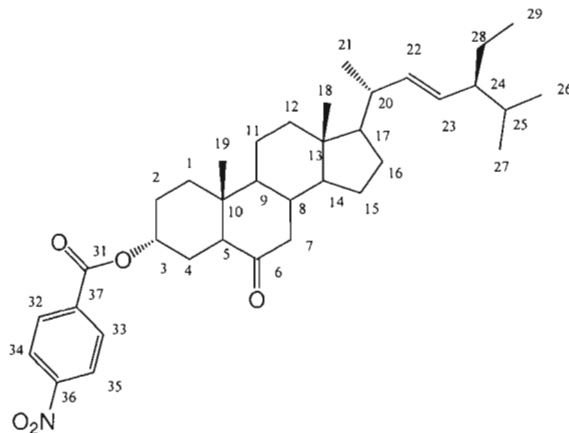


525 mg (1,12 mmol, 1,00 éq) de l'acétate **55** est suspendu dans 45 mL de MeOH. On ajoute à cette suspension 2,25 g (5 % m/v) de KOH et on agite le mélange obtenu à température ambiante pendant 2h. La solution claire obtenue est concentrée sous vide. Le résidu jaune pâle obtenu est dilué à l'eau puis extrait avec EtOAc (x 3), lavée à l'eau (x 3), lavée avec une solution saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (x 2) puis avec une solution de NaCl saturée (x 2). La phase organique est séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après concentration sous vide on obtient 447 mg d'un solide jaune pâle. Le solide est filtré sur une colonne de silice pour éliminer les impuretés colorées. L'élution avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  4% nous a permis d'obtenir 425 mg de **33** (89%) sous la forme d'un solide cristallin blanc.  $T_{\text{fus}}$  (EtOH) 153-155°C.

**RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,14 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,04 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 3,58 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,30 (dd, 1H, H-5,  $J_1 = 5$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz), 2,23 (dd, 1H, H-7,  $J_1 = 3$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz), 2,10-1,10 (m, 28 H), 1,03 (d, 3H, H-21,  $J = 6$  Hz), 0,88-0,74 (m, 9 H), 0,66 (s, 3H, H-18). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 211,2 (C-6), 138,2 (C-22), 129,8 (C-23), 70,9 (C-3), 57,1, 57,0, 56,1,

54,2, 51,5, 47,0, 43,1, 41,2, 40,6, 39,6, 38,1, 36,9, 32,1, 30,9, 30,3, 29,0, 25,6, 24,3, 21,7 21,4, 21,3, 19,2, 13,4, 12,5, 12,4. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 3411, 2946, 2867, 1708, 1459, 1383, 1062, 968. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 428 ( $M^+$ ) (80), 410 (25), 385 (30), 367 (60), 316 (85), 287 (100). **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$  (429,3727 ( $M+H^+$ ), trouvée (429,3727 ( $M+H^+$ )).

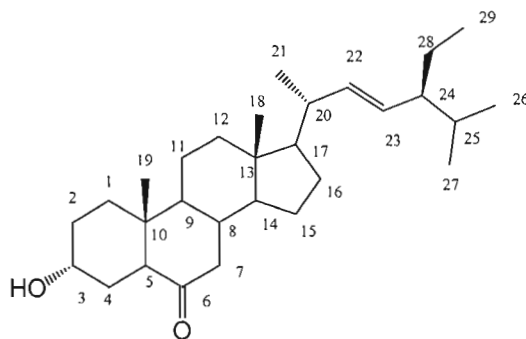
### 8.3.5 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -(4-nitrobenzoyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (60)



Sous atmosphère inerte et en condition anhydre, on place 400 mg (0,93 mmol, 1,00 éq) de l'alcool **33**, 978 mg de triphénylphosphine (3,73 mmol, 4,00 éq) et 0,623 g d'acide *p*-nitrobenzoïque (3,73 mmol, 4,00 éq) dans un ballon sec de 50 mL. À ce mélange de solides est ajouté 20 mL de THF anhydre à l'aide d'une seringue. La solution obtenue est refroidie à 0°C avec un bain de glace. On ajoute à cette solution 0,75 mL de DEAD (3,73 mmol, 4,00 éq) goutte à goutte pendant 15 minutes. La solution orangée obtenue est agitée à 0°C pendant 20 min puis à température ambiante pendant 24 h. Le mélange obtenu est dilué à l'eau puis extrait au  $\text{CHCl}_3$  (x 3). La phase organique est lavée à l'eau (x 3) puis avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (x 2) et avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$  (x 2). La phase organique est ensuite séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après concentration sous vide on obtient un semi solide orangé. Ce semi solide est ensuite placé sur une

colonne de silice et élué avec du  $\text{CHCl}_3$ . On obtient 328 mg de **60** (61% brut) sous la forme d'un solide jaune pâle. Le spectre  $\text{RMN}^1\text{H}$  montre quelques impuretés mineures. **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8,30 (d, 2H,  $J = 9$  Hz, H-34 et H-35), 8,21 (d, 2H,  $J = 9$  Hz, H-32 et H-33), 5,42 (m, 1H, H-3 $\beta$ ), 2,64 (dd, 1H,  $J_1 = 12$  Hz,  $J_2 = 4$  Hz, H-5), 2,32 (dd, 1H,  $J_1 = 3$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz), 1,02 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, H-21), 2,10-1,10 (m, 32 H), 0,83-0,75 (m, 9H), 0,70 (s, 3H, H-18). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 211,6 (C-6), 164,0 (C-31), 150,7 (C-36), 138,2 (C-22), 136,4 (C-37), 130,8 (C-32 et C-33), 129,9 (C-23), 123,8 (C-34 et C-35), 71,2 (C-3), 57,1, 56,2, 54,3, 53,1, 47,0, 43,1, 41,6, 40,7, 39,6, 38,2, 32,9, 32,1, 29,0, 25,6, 25,3, 24,2, 21,4, 21,3, 19,2, 12,7, 12,5.

### 8.3.6 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**36**)

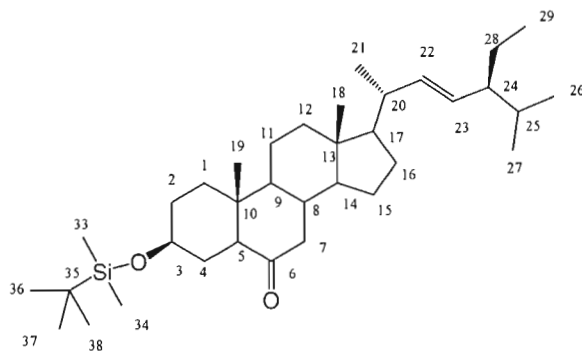


320 mg (0,55 mmol, 1,00 éq) de l'ester brut **60** est suspendu dans 30 mL de MeOH. À cette suspension est ajouté 0,375 g de NaOH (1,25 % m/v). Le mélange résultant est agité à température ambiante pendant 14 h. La solution jaune obtenue est concentrée sous vide, diluée à l'eau puis extraite à l'EtOAc (x 3). La phase organique est lavée avec de l'eau (x 3), une solution saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (x 2) puis avec une solution saturée de NaCl (x 2). La phase organique est séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après évaporation sous vide on obtient 227 mg d'un solide jaune. Ce solide est purifié par chromatographie éclair et l'élution avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1 % nous a permis d'obtenir 196 mg de **36** (49 % deux étapes) sous la



forme d'un solide blanc poudreux.  $T_{fus}$  (EtOH) 194-196°C. **RMN  $^1H$**  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,14 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,04 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 4,17 (m, 1H, H-3 $\beta$ ), 2,68 (m, 1H, H-5), 2,25 (dd, 1H,  $J_1 = 13$  Hz,  $J_2 = 3$  Hz), 2,08-1,08 (m, 28 H), 1,03 (d, 3H  $J = 6$  Hz, H-21), 0,98-0,72 (m, 9H), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN  $^{13}C$**  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 213,0 (C-6), 138,3 (C-22), 129,8 (C-23), 65,7 (C-3), 57,2, 56,1, 54,1, 51,9, 51,5, 47,1, 43,1, 41,8, 40,6, 39,6, 38,2, 32,1, 31,9, 29,0, 28,4, 27,9, 25,6, 24,2, 21,4, 21,3, 19,2, 12,5, 12,4. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $cm^{-1}$ )) 3290, 2941, 2869, 1707, 1465, 1000, 966. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 428 ( $M^+$ ) (20), 410 (80), 367 (60), 316 (55), 271 (100). **SMHR** calculée pour  $C_{29}H_{48}O_2$  (429,3730 ( $M+H$ ) $^+$ ), trouvée (429,3727 ( $M+H$ ) $^+$ ).

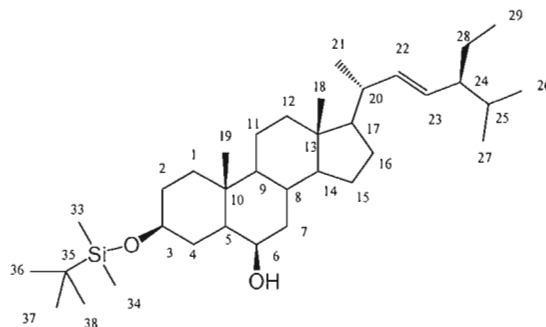
### 8.3.7 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**62**)



350 mg (0,82 mmol, 1,00 éq) de l'alcool **33** est dissous dans 25 mL de  $CH_2Cl_2$  anhydre. À cette solution est ajouté 222 mg d'imidazole (3,27 mmol, 4,00 éq) puis la température du mélange réactionnelle est abaissée à 0°C avec un bain de glace. On ajoute ensuite 296 mg (1,96 mmol, 2,40 éq) de TBDMSCl à la solution et on agite à 0°C pendant 15 min. Le bain de glace est retiré puis la solution est agitée à température ambiante pendant 24h. Le mélange réactionnel est filtré sous vide sur Celite<sup>®</sup>. La Celite<sup>®</sup> est rincée avec du  $CH_2Cl_2$  puis le filtrat obtenu est lavée avec une solution aqueuse de HCl 10 % (x 3). La phase organique est ensuite lavée à

l'eau (x 3) puis avec une solution saturée de NaCl (x 2). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après évaporation on obtient 393 mg d'un solide blanc. Ce solide blanc est purifié par chromatographie éclair. En éluant avec du  $\text{CHCl}_3$  on obtient 368 mg de **62** (83%) sous la forme d'un solide blanc.  $T_{\text{fus}}$  179-180°C. **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,12 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,02 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 3,48 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,31 (dd, 1H,  $J_1 = 5$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz, H-5), 2,20-1,01 (m, 28 H), 1,02 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, H-21), 0,90-0,71 (m, 18 H), 0,63 (s, 3H, H-18), 0,00 (s, 6H, H-33 et H-34). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 211,3 (C-6), 138,2 (C-22), 129,8 (C-23), 71,7 (C-3), 57,2, 51,5, 47,0, 43,1, 41,2, 40,6, 39,7, 38,1, 37,1, 32,1, 31,5, 30,5, 29,0, 26,1 (C-36, C-37, C-38), 25,6, 24,3, 21,7, 21,4, 21,3, 19,2, 18,4, 13,4, 12,5, 12,4, -4,4 et -4,5 (C-33 et C-34) **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 2965, 2856, 1701, 1451, 1380, 1244, 1080, 982, 841, 781. **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{O}_2\text{Si}$  (565, 4416 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ), trouvée (565, 4411 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ).

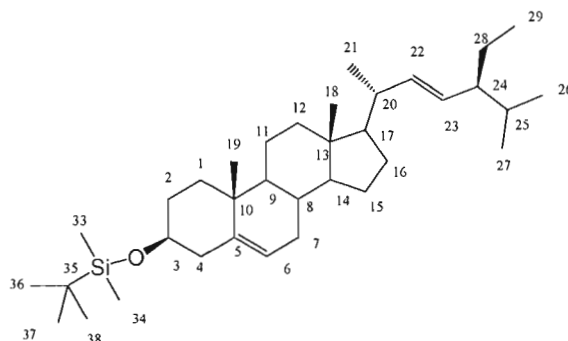
### 8.3.8 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol (**63**)



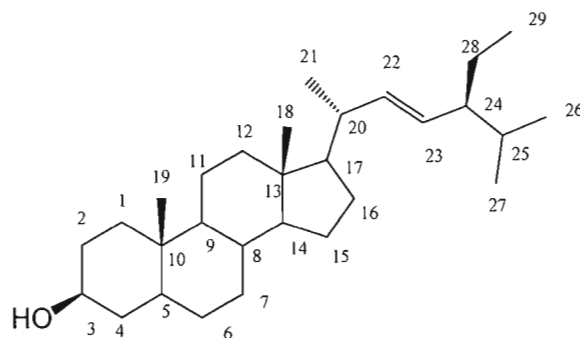
Une solution de chlorure de cérium (III) est préparée en dissolvant 89 mg (0,24 mmol, 1,30 éq) de chlorure de cérium heptahydraté dans 1,0 mL de MeOH. On abaisse la température de cette solution à 0°C avec un bain de glace. On ajoute ensuite par petites portions 8,0 mg de  $\text{NaBH}_4$  (0,20 mmol, 1,10 éq) à cette solution. La solution hétérogène blanche obtenue est agitée pendant 5 minutes à 0°C. On

ajoute ensuite lentement cette solution de  $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3$  à une solution de 100 mg (0,18 mmol, 1,00 éq) de l'éther silylé (**62**) dans 10 mL d'EtOH refroidie à 0°C. Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 60 minutes. On dilue ensuite le mélange réactionnel avec de l'eau. On extrait ensuite le produit désiré avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x 3). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (x 3). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après évaporation sous vide on obtient 88 mg d'un solide blanc. Ce solide est purifié par chromatographie éclair et l'élution avec un gradient  $\text{CHCl}_3$ /Hexanes (50% Hexanes  $\rightarrow$  0% Hexanes) permet d'obtenir 62 mg de **63** (62%) sous la forme d'un solide blanc. Nous avons aussi isolé 11 mg du produit de départ **62** lors de la chromatographie. **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,13 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,06 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 3,71 (m, 1H, H-6 $\alpha$ ), 3,48 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,10-0,91 (m, 33H), 0,88 (m, 18 H), 0,63 (s, 3H, H-18), 0,00 (s, 6H, H-33, H-34). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 138,7 (C-22), 129,6 (C-23), 72,8 et 72,5 (C-2 et C-3), 56,7, 56,4, 54,7, 51,6, 47,9, 42,9, 40,9, 40,2, 39,8, 39,0, 36,2, 35,8, 32,3, 32,2, 30,7, 29,3, 26,3 (C-36, C-37, C-38) 25,8, 24,7, 21,6, 21,5, 21,4, 19,3, 18,6, 16,2, 12,6, -4,2. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 526 ( $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ) $^+$  (2), 486 (10), 469 (100), 394 (80), 255 (90).

### 8.3.9 Préparation du (22E, 24S)-3β-(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-stigmasta-5,22-diene (**65**)



La méthode pour la préparation de **65** est la même que celle utilisée lors de la préparation de l'éther silylé **62**. Dans les mêmes conditions nous avons traité 200 mg (0,48 mmol) de stigmastérol 95 % avec TBDMSCl et avons obtenu 242 mg d'un solide grisâtre. La purification par chromatographie éclair de ce brut en utilisant un mélange  $\text{CHCl}_3$ /Hexanes (9 : 1) a mené à l'obtention de 220 mg (92%) de **65** sous la forme d'un solide gris pâle.  $T_{\text{fus}}$  124-126°C. **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,31 (m, 1H, H-6), 5,14 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,07 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 3,48 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,32-1,08 (m, 31 H), 0,89 (s, 9H, H-36, H-37, H-38), 0,88-0,80 (m, 9H), 0,69 (s, 3H, H-18), 0,06 (s, 6H, H-33, H-34). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 141,9 (C-5), 138,7 (C-22), 129,6 (C-23), 121,5 (C-6), 73,0 (C-3), 57,3, 56,3, 51,6, 50,6, 43,2, 42,6, 40,8, 40,1, 37,8, 37,0, 32,5, 32,3, 32,2, 29,3, 26,3 (C-36, C-37, C-38), 25,8, 24,7, 21,6, 21,5, 19,8, 19,3, 18,6, 12,6, 12,4, -4,2 (C-33, C-34). **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 2954, 2856, 1456, 1380, 1255, 1380, 1255, 1086, 971, 835, 770. **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{OSi}$  (549,4452 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ), trouvée (549,4462 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ).

8.3.10 Préparation du (22E, 24S)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (**34**)

400 mg de l'alcool **33** (0,93 mmol, 1,00 éq) est suspendu dans 12 mL d'un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  (6 :1). On ajoute à cette suspension 0,24 g de  $p\text{-TsNHNH}_2$  (1,30 mmol, 1,40 éq) et 17 mg de APTS (0,10 mmol, 0,11 éq). Le mélange obtenu est chauffé à reflux pendant 4 h. On dilue ensuite le mélange à l'eau et on procède à l'extraction du produit désiré à l'aide de  $\text{CHCl}_3$  (x 4). La phase organique est lavée à l'eau (x 3), avec une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée (x 3) puis avec une solution de  $\text{NaCl}$  saturée (x 2). Après concentration sous vide on obtient 0,41 g du produit de condensation **71** brut. **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  (597,4076 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>), trouvée (597,4084 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>).

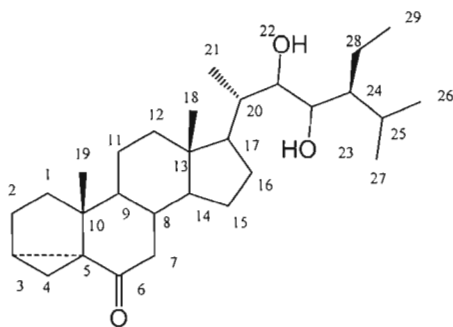
280 mg (0,46 mmol, 1,00 éq) de ce produit de condensation brut est ensuite dissous dans 20 mL d' $\text{EtOH}$  anhydre. On ajoute ensuite par petites portions 32 mg (0,83 mmol, 1,80 éq) de  $\text{NaBH}_4$ . La solution obtenue est chauffée à reflux pendant 8h. Le mélange réactionnel est refroidi puis extrait avec du  $\text{CHCl}_3$  (x 3). La phase organique est lavée avec une solution de  $\text{HCl}$  (1M) (x 2), une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (x 3), puis avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$  (x 2). On obtient 212 mg d'un solide beige. Ce solide est purifié par chromatographie éclair en éluant avec un mélange de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  2%. On obtient 162 mg (42% 2 étapes) de l'alcool **34** sous la forme d'un solide blanc. Les spectres RMN montrent la présence d'impuretés mais ce résultat est préliminaire et la molécule n'a pas été utilisée lors des tests biologiques.

$T_{\text{fus}}$  140-142°C **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,12 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,05 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 3,58 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,12-0,68

(m, 44 H), 0,67 (s, 3H, H-18). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 138,6 (C-22), 129,4 (C-23), 71,6 (C-3), 56,8, 56,3, 54,6, 51,5, 45,1, 42,7, 40,7, 40,2, 38,5, 37,2, 35,7(2), 32,3, 32,1, 31,8, 29,1, 29,0, 25,6, 24,5, 21,5, 21,4, 21,3, 19,2, 12,6, 12,5. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 3351, 2943, 2856, 1451, 1364, 1059, 960. **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  (437,3758 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ), trouvée (437,3754 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ ).

## 8.4 Préparation des molécules présentées au chapitre V

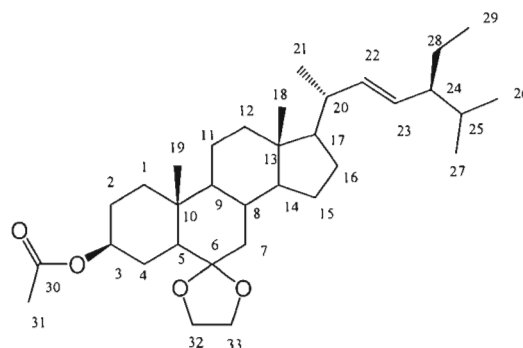
### 8.4.1 Préparation du (22*E*, 24*S*)-22,23-dihydroxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmastan-6-one (**72**)



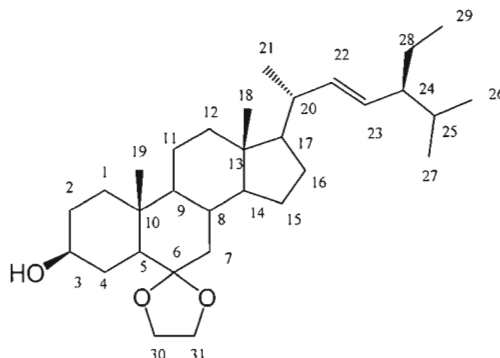
La préparation du diol **72** utilise le même protocole que lors de la formation du tétralol **24**. On traite 100 mg (0,24 mmol, 1,00 éq) de la cétone **28** dans les conditions de Sharpless dans 5 mL de  $\text{t-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) (telles que décrites dans la synthèse de **24**). Après 36 jours la réaction est arrêtée en ajoutant un excès de bisulfite de sodium (86 mg). Après extraction, lavage et séchage du produit désiré, on obtient 75 mg d'un solide jaune-vert. Ce produit est purifié par chromatographie éclair en éluant d'abord avec un mélange de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  2%. Le solide jaune obtenu est ensuite purifié de nouveau par chromatographie éclair en utilisant un gradient  $\text{Bz}/\text{EtOAc}$  (0  $\rightarrow$  20%). On obtient 46 mg de **72** (41%) sous la forme d'un solide blanc. **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3,61 (m, 2H, H-22, H-23), 2,45-1,05 (m, 31 H), 1,04 (s, 3H, H-19), 1,02 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, H-21), 1,01-0,70 (m, 6H), 0,72 (s, 3H, H-18). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 209,9 (C-6), 72,4 (C-22),

70,8 (C-23), 56,8, 52,8, 49,9, 46,9, 46,5, 46,3, 44,9, 43,5, 42,6, 39,9, 36,5, 35,0, 33,7, 29,9, 28,1, 27,1, 26,1, 24,5, 23,1, 22,0, 19,9, 18,8, 17,9, 14,7, 14,3, 12,2, 11,9.

#### 8.4.2 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3β-acétoxy-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5α-stigmast-22-ene (**77**)



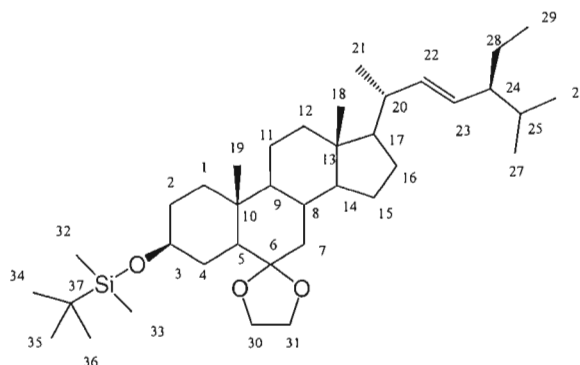
500 mg de l'acétate **55** est dissous dans 30 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . On ajoute ensuite 0,60 mL d'éthylène glycol (10,6 mmol, 10,0 éq), 0,45 mL de  $\text{CH}(\text{OMe})_3$  (3,80 mmol, 3,60 éq) et 18 mg de APTS (0,11 mmol, 0,10 éq). La solution obtenue est agitée à température ambiante pendant 3h30. La solution résultante est lavée à l'eau (x 3), puis avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (x 2) et avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$  (x 2). La phase organique est séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après concentration on obtient 526 mg d'une huile jaune pâle. Cette huile est purifiée par chromatographie éclair en éluant avec du  $\text{CHCl}_3$ . On obtient 485 mg de **77** (87%) sous la forme d'une huile incolore. **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,10 (dd, 1H,  $J_1 = 8 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 15 \text{ Hz}$ , H-22), 5,03 (dd, 1H,  $J_1 = 8 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 15 \text{ Hz}$ , H-23), 4,68 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), [(3,98-3,82 (m, 3H), (3,72, m, 1H), H-32 et H-33], 2,02 (s, 3H, H-31), 2,05-1,07 (m, 29H), 1,02 (d, 3H,  $J = 6 \text{ Hz}$ , H-21), 0,94-0,69 (m, 9H), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 170,7 (C-30), 138,5 (C-22), 129,5 (C-3), 109,7 (C-6), 74,1 (C-3), 65,7 et 64,4 (C-32, C-33), 56,3, 56,2, 53,7, 51,5, 50,7, 42,7, 41,5, 40,7, 39,9, 38,1, 37,1, 33,6, 32,1, 29,1, 27,4, 25,6, 25,5, 24,5, 21,7, 21,4, 21,3(2), 19,2, 14,4, 12,5. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 514 ( $\text{M}^+$ ) (10), 454 (5), 317 (100).

8.4.3 Préparation du (22*E*, 24*S*)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (**78**)

485 mg (0,94 mmol, 1,00 éq) du céral **77** est ajouté à 25 mL de MeOH. On ajoute ensuite 1,30 g de KOH (5% m/v) et on agite à température ambiante pendant 1h30. On concentre la solution obtenue sous vide et on dissout le résidu obtenu avec de l'eau, puis on procède à l'extraction avec l'EtOAc (x 3). La phase organique obtenue est lavée avec de l'eau (x 3), avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2) et avec une solution saturée de NaCl (x 2). La phase organique est séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on obtient 326 mg d'une huile jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie éclair en éluant avec un gradient CHCl<sub>3</sub>/MeOH (0 → 4 %). On obtient 254 mg de **78** (60%) sous la forme d'une mousse blanchâtre. Le spectre RMN <sup>1</sup>H contient des impuretés mineures à 4,15 ppm et 7,20 ppm. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,12 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 8 Hz, J<sub>2</sub>= 15 Hz, H-22), 5,05 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 8 Hz, J<sub>2</sub>= 15 Hz, H-23), 3,98-3,72 (m, 4H, H-30, H-31), 3,56 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,20-1,07 (m, 30 H), 1,01 (d, 3H, J= 6 Hz, H-21), 0,98-0,69 (m, 9H), 0,67 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 138,5 (C-22), 129,5 (C-23), 109,9 (C-6), 71,7 (C-3), 65,7 et 64,5 (C-30, C-31), 56,3, 56,2, 53,9, 51,4, 50,9, 42,7, 41,6, 40,7, 39,9, 38,5, 37,1, 33,6, 32,1, 31,4, 29,4, 29,1, 25,6, 24,5, 21,4, 21,3, 19,2, 14,5, 12,5.

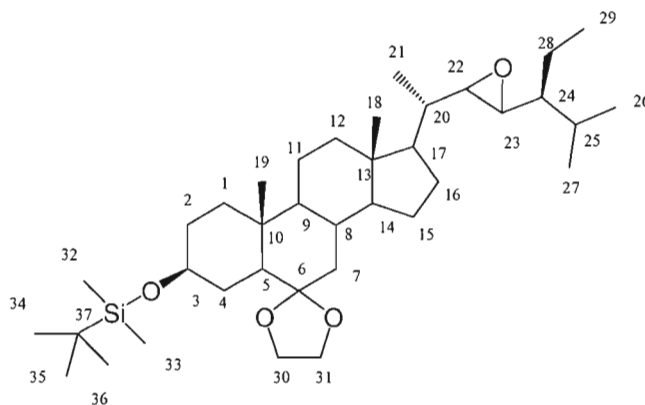


8.4.4 Préparation du (22*E*, 24*S*)-3β-(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5α-stigmast-22-ene (**79**)



La préparation de l'éther silylé **79** est la même que celle de l'éther silylé **62**. On utilise 250 mg (0,53 mmol, 1,00 éq) de l'alcool **78** dans 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En utilisant le protocole pour (**62**) et en purifiant le produit obtenu par chromatographie éclair en éluant avec un mélange de CHCl<sub>3</sub>/Hexanes (1 :1), on obtient finalement 260 mg de **79** (84 %) sous la forme d'une huile incolore. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,13 (m, 2H, H-22, H-23), 3,98-3,70 (m, 4H, H-30,H-31), 3,55 (m, 1H, H-3α), 2,10-0,69 (m, 50 H), 0,68 (s, 3H, H-18), 0,05 (s, 6H, H-32, H-33). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 138,6 (C-22), 129,6 (C-23), 110,1 (C-6), 72,7 (C-3), 65,8 et 64,7 (C-30, C-31), 56,5, 56,4, 54,1, 51,6, 51,2, 42,9, 41,9, 40,8, 40,1, 38,8, 37,2, 33,8, 32,2, 32,1, 29,9, 29,2, 26,3 (C-34, C-35, C-36), 26,2, 26,0, 25,7, 24,6, 21,5, 21,4, 19,3, 18,6, 14,7, 12,6, -4,1 (C-32, C-33). **SMBR** (*m/z*, intensité relative) 529 (M-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>+</sup> (10), 485 (100), 411 (2).

8.4.5 Préparation du (24*S*)-3β-(1,1-diméthyl-(1,1-diméthylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-22,23-oxido-5α-stigmastane (**80**)

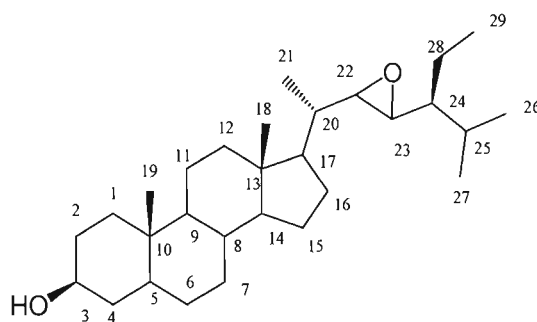


215 mg (0,37 mmol, 1,00 éq) de l'éther silylé **79** est dissous dans 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ . On ajoute à cette solution 0,15 g de MCPBA (0,89 mmol, 2,40 éq) et 0,44 g de  $\text{NaHCO}_3$  (5,30 mmol, 14,3 éq). La solution est portée à reflux pendant 1h30. Le mélange réactionnel obtenu est versé sur 20 mL de toluène. On ajoute ensuite 10 mL d'une solution de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  10% au mélange réactionnel puis on agite à température ambiante pendant 2 h. On extrait le produit désiré avec du toluène (x 2). La phase organique est lavée avec de l'eau (x 3) puis avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$  (x 2). La phase organique est séchée avec  $\text{MgSO}_4$  et filtrée. Après évaporation sous vide on obtient 142 mg d'une huile incolore. Cette huile est purifiée par chromatographie éclair et l'élution avec du  $\text{CHCl}_3$  permet d'obtenir 113 mg de **80** (52%) sous la forme d'une huile incolore. Notons que l'on obtient un mélange d'isomères en C-22,C-23. L'assignation des signaux est possible grâce aux travaux de Timofeev<sup>(70)</sup> **RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3,98-3,68 (m, 4H, H-30, H-31), 3,45 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2,71 (dd,  $J_1 = 7$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz, 1H, H-22*R*), 2,44 (m, 3H, H-23*R*, H-22*S*, H-23*S*), 2,01-0,85 (m, 39 H), 0,83 (s, 9H, H-34, H-35, H-36), 0,62 (s, 3H, H-18), 0,00 (s, 6H, H-32,H-33). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 110,0 (C-6), 72,7 (C-3), 65,8 et 64,6 (C-30, C-31), 63,5 et 62,4 et 58,9 (C-22 et C-23), 56,5, 56,0(2), 54,1(2), 53,9, 51,2, 49,1, 48,6, 43,3(2), 41,8, 39,2, 39,0, 37,2, 32,0, 29,8, 29,7, 29,5, 26,3 (C-34, C-35, C-36), 26,2 (2), 24,8, 21,4, 21,3, 21,2, 20,5, 19,9, 19,8(2), 18,6,

16,6, 14,7, 12,8, 12,7, 12,5, 12,4, -4,1 et -4,2 (C-32, C-33). **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 545 ( $M-OCH_2CH_2O$ )<sup>+</sup> (15), 501 (100), 387 (30). Diastéréosélection 1 : 1 selon l'analyse CPG-SM.

Étant donné que la présence du groupement OTBDMS fait que certains pics sont faibles en intensité, nous présentons aussi le protocole et les spectres obtenus pour l'époxyde (**75**) afin d'améliorer la compréhension des spectres.

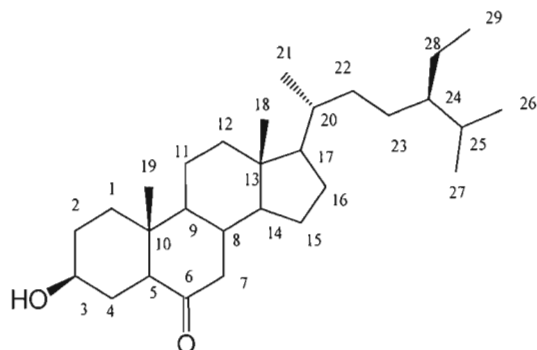
#### 8.4.6 Préparation du (24*S*)-3β-hydroxy-22,23-oxido-5α-stigmastan-6-one (**75**)



Le protocole utilisé est le même que pour l'époxyde **80**. En utilisant 168 mg (0,39 mmol, 1,00 éq) de l'alcool **33** dans les mêmes conditions puis en purifiant le produit obtenu par chromatographie éclair en éluant avec un mélange Benzène/EtOAc (80 : 20), on obtient 32 mg de **75** (18 %) sous la forme d'un semi solide cireux. Mélange d'isomères en C-22, C-23 impossible à quantifier au GC mais selon les intégrations <sup>1</sup>H, ça semble être le *S,S*. Les valeurs suivantes d'intégrations sont corrigées pour représenter le nombre réel d'hydrogènes de chacun des isomères du mélange. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3,57 (1H, m, H-3α), 2,72 (dd,  $J_1 = 7$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz, 1H, H-22*R*), 2,48 (m, 3H, H-23*R*, H-22*S*, H-23*S*), 2,30 (dd,  $J_1 = 5$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz, 1H, H-5), 2,15-0,82 (m, H), 0,75 (s, 3H, H-19), 0,67 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 211,0 (C-6), 70,9 (C-3), 63,2 et 62,2 et 58,8 (C-22 et C-23), 58,8,

57,0, 56,6, 56,2, 54,2, 54,1, 53,6, 49,0, 48,5, 46,9, 43,6, 43,5, 41,1, 39,6, 39,5, 39,0, 38,7, 38,1, 36,9, 30,9, 30,3, 29,6, 29,4, 28,0, 27,1, 24,4, 21,7, 21,2, 20,4, 19,8, 19,6.

#### 8.4.7 Préparation du (24S)-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**81**)



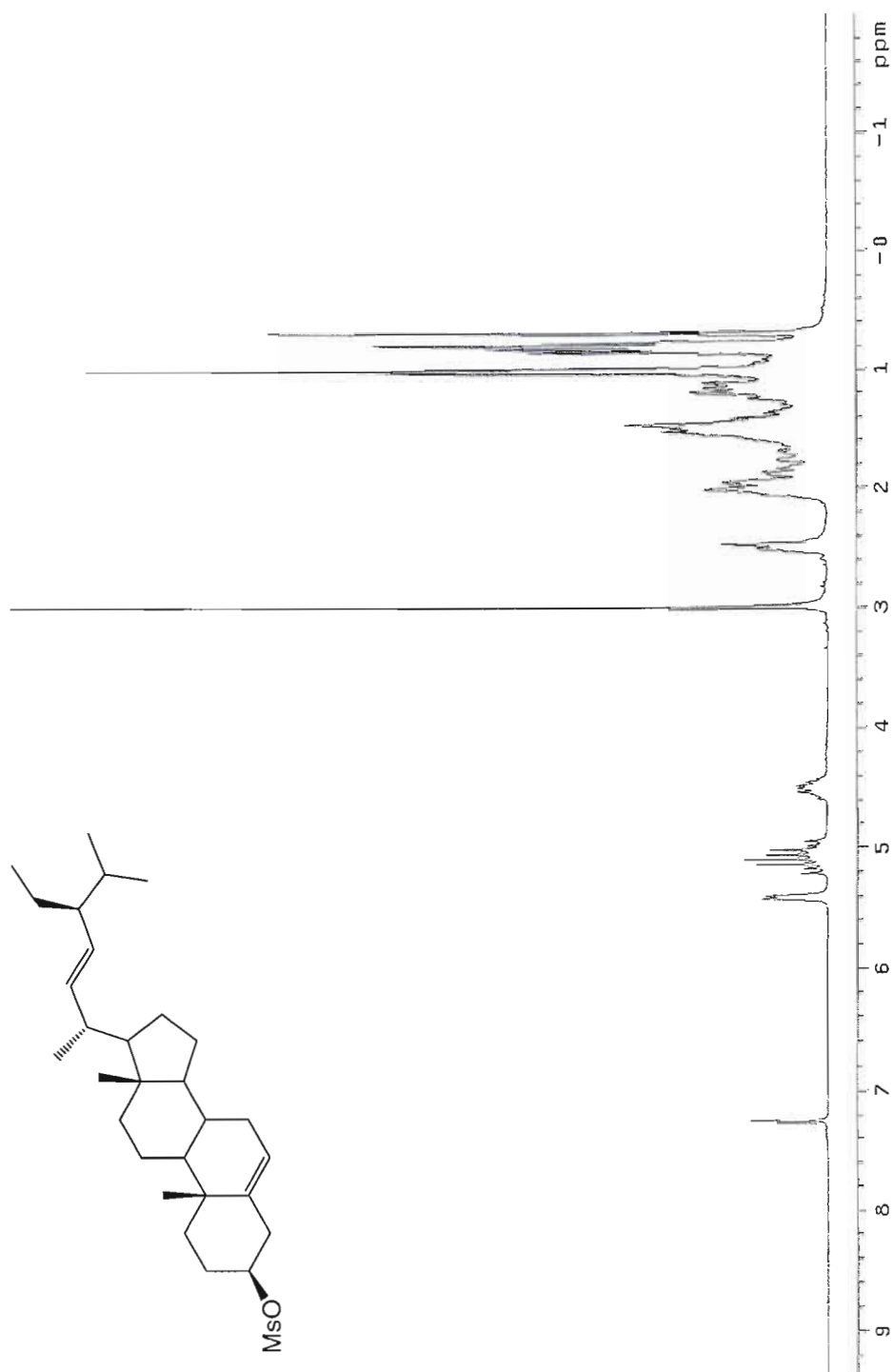
100 mg (0,23 mmol, 1,00 éq) de l'alcool **33** est dissous dans 2,5 mL d'EtOAc. On ajoute à cette solution 20 mg de Pd/C 10%. Le ballon contenant la solution est scellé puis placée sous atmosphère d'hydrogène (1 atm). L'hydrogène est directement bullé pendant 5 min puis la solution est agitée pendant 3h sous atmosphère d'hydrogène. L'étape précédente est répétée 2 fois puis la solution est agitée à température ambiante pendant 14h sous atmosphère d'hydrogène. Le mélange obtenu est filtré sur Celite<sup>®</sup>. Le filtrat obtenu est ensuite lavé à l'eau (x 2) puis avec une solution saturée de NaCl (x 2). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on obtient 95 mg d'un solide cireux amorphe. Ce solide est purifié par chromatographie éclair et l'élution avec un gradient CHCl<sub>3</sub>/MeOH (0 → 6 %) permet d'obtenir 65 mg de **81** (65 %) sous la forme d'un solide blanc. **T<sub>fus</sub>** 118-120°C. **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 3,57 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 2,38 (dd, 1H,  $J_1 = 5$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz, H-5), 2,20-0,82 (m, 45 H), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 211,2 (C-6), 70,9 (C-3), 57,0(2), 56,2, 54,2, 47,0, 46,0, 43,2, 41,2, 39,7, 38,1, 36,9, 36,3, 34,1, 30,9, 30,3, 29,4, 28,3, 26,3, 24,2, 23,3, 21,7, 20,0, 19,2, 18,9, 13,4, 12,2(2). **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 2395, 2354,

1716, 1531, 1416, 1052, 927. **SMHR** calculée pour  $C_{29}H_{50}O_2$  (432,3920 (M+H)<sup>+</sup>),  
trouvée (432,3918 (M+H)<sup>+</sup>).

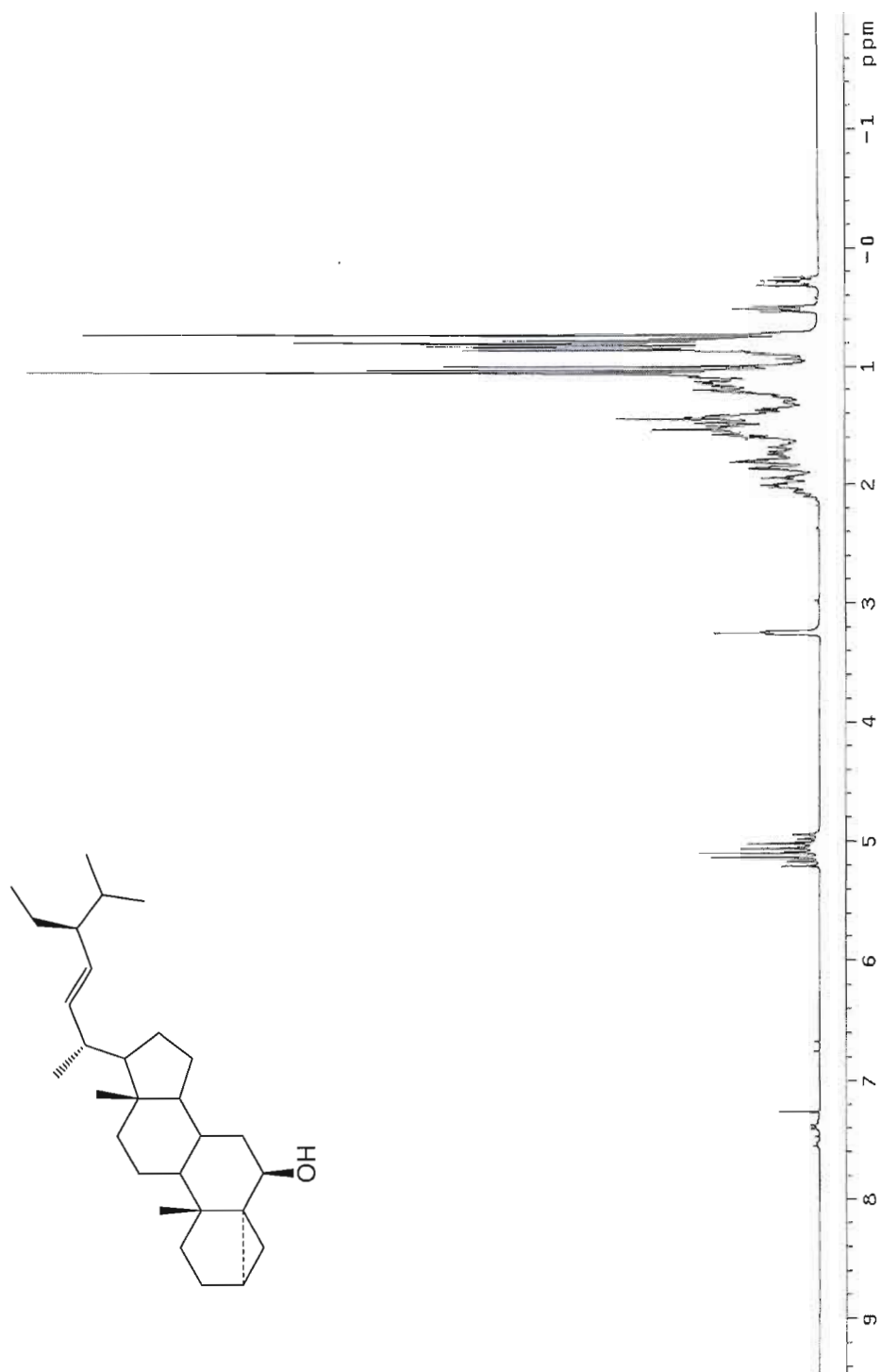
## **APPENDICE A**

### **SPECTRES RMN $^1\text{H}$**

(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(methylsulfonyloxy)-stigmasta-5,22-diene (**47**)

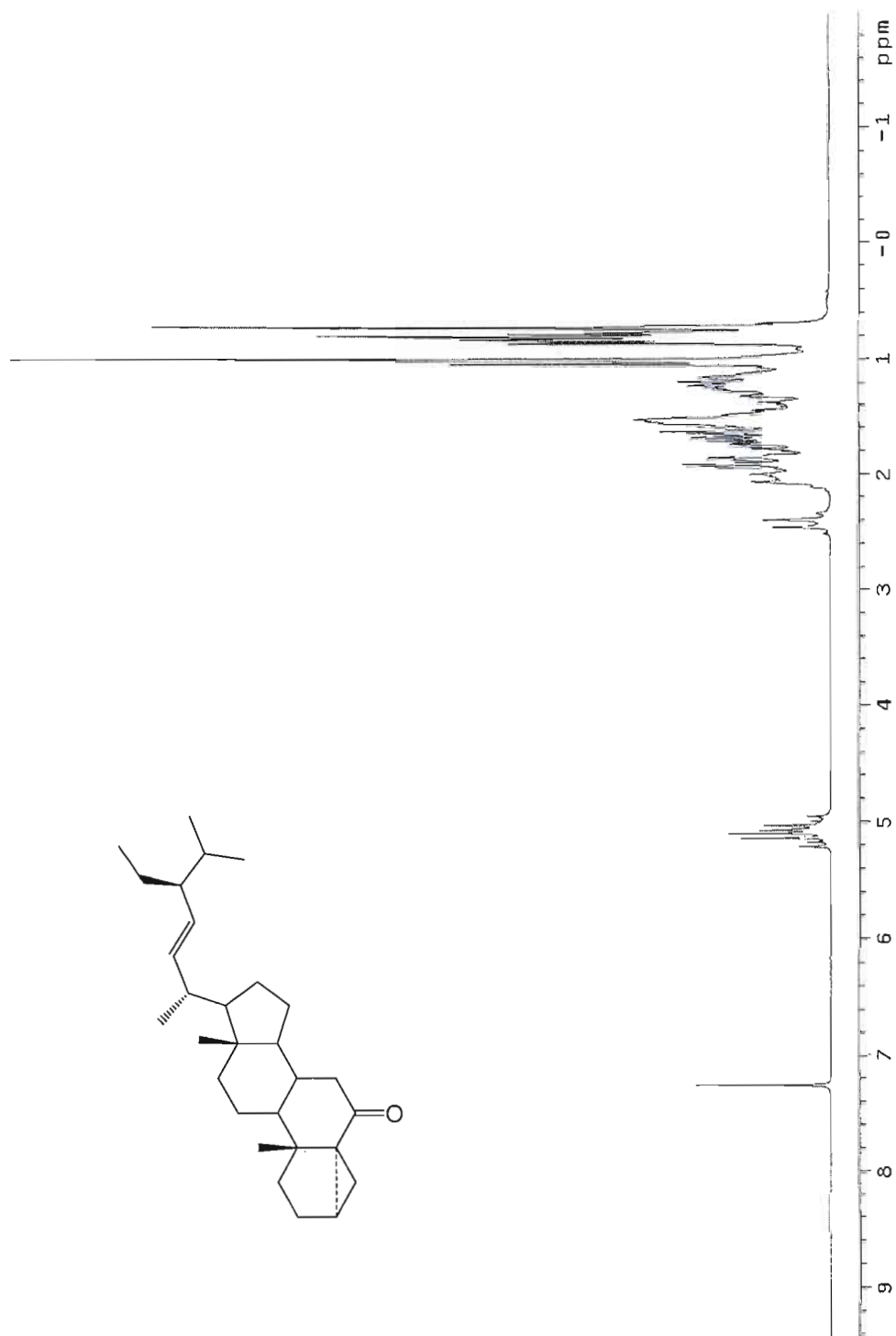


(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol (**31**)

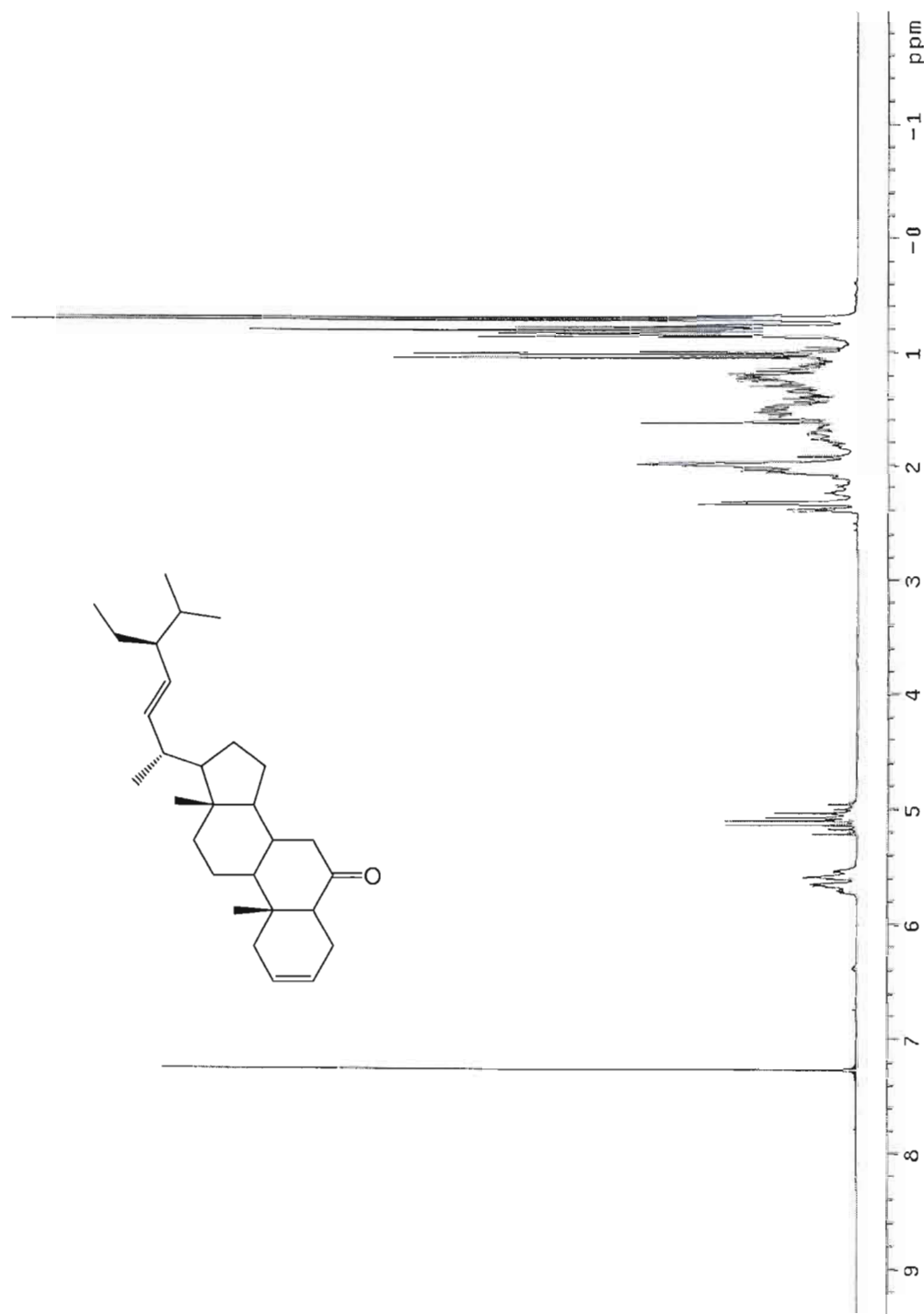




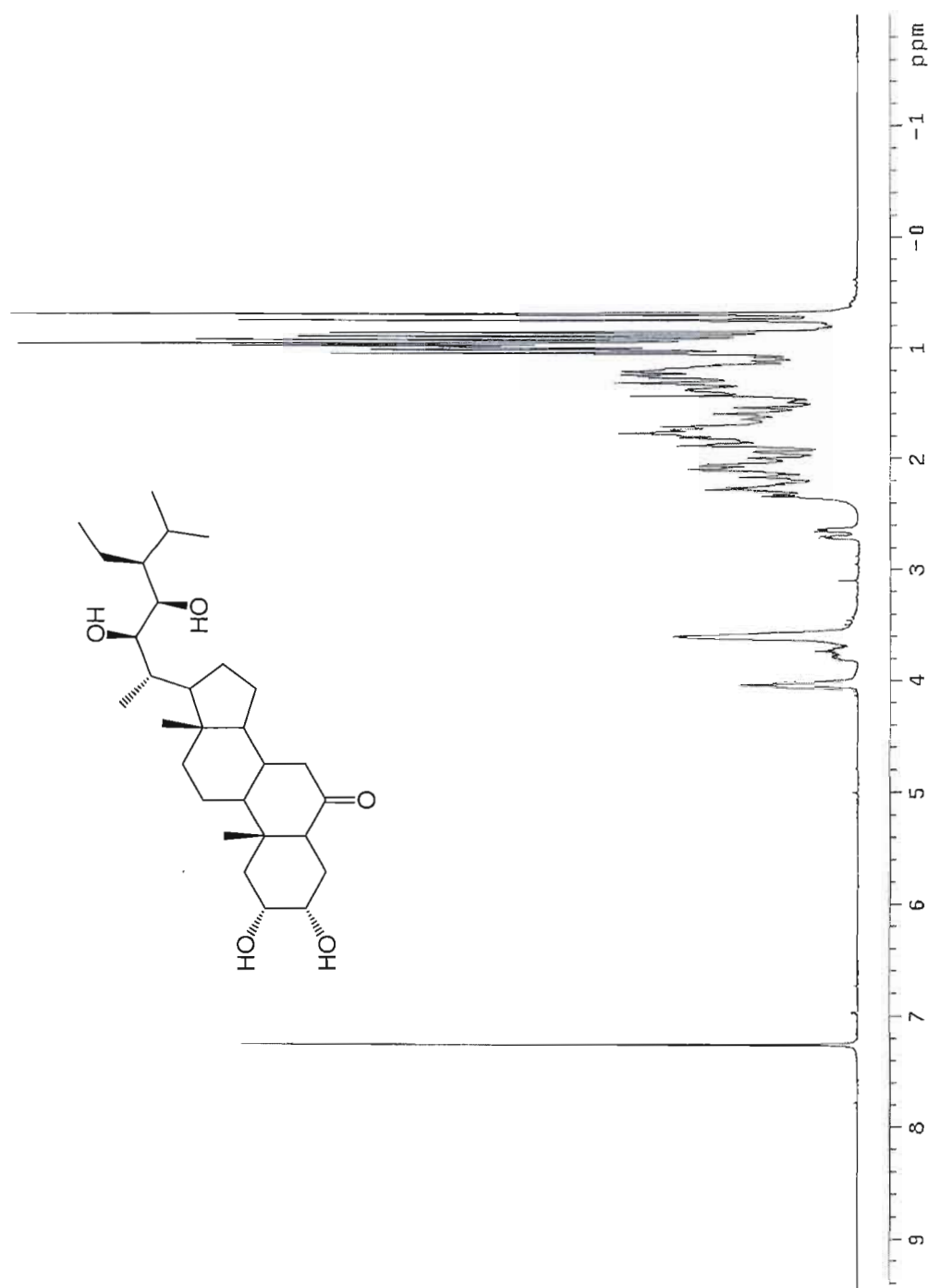
(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one (**28**)



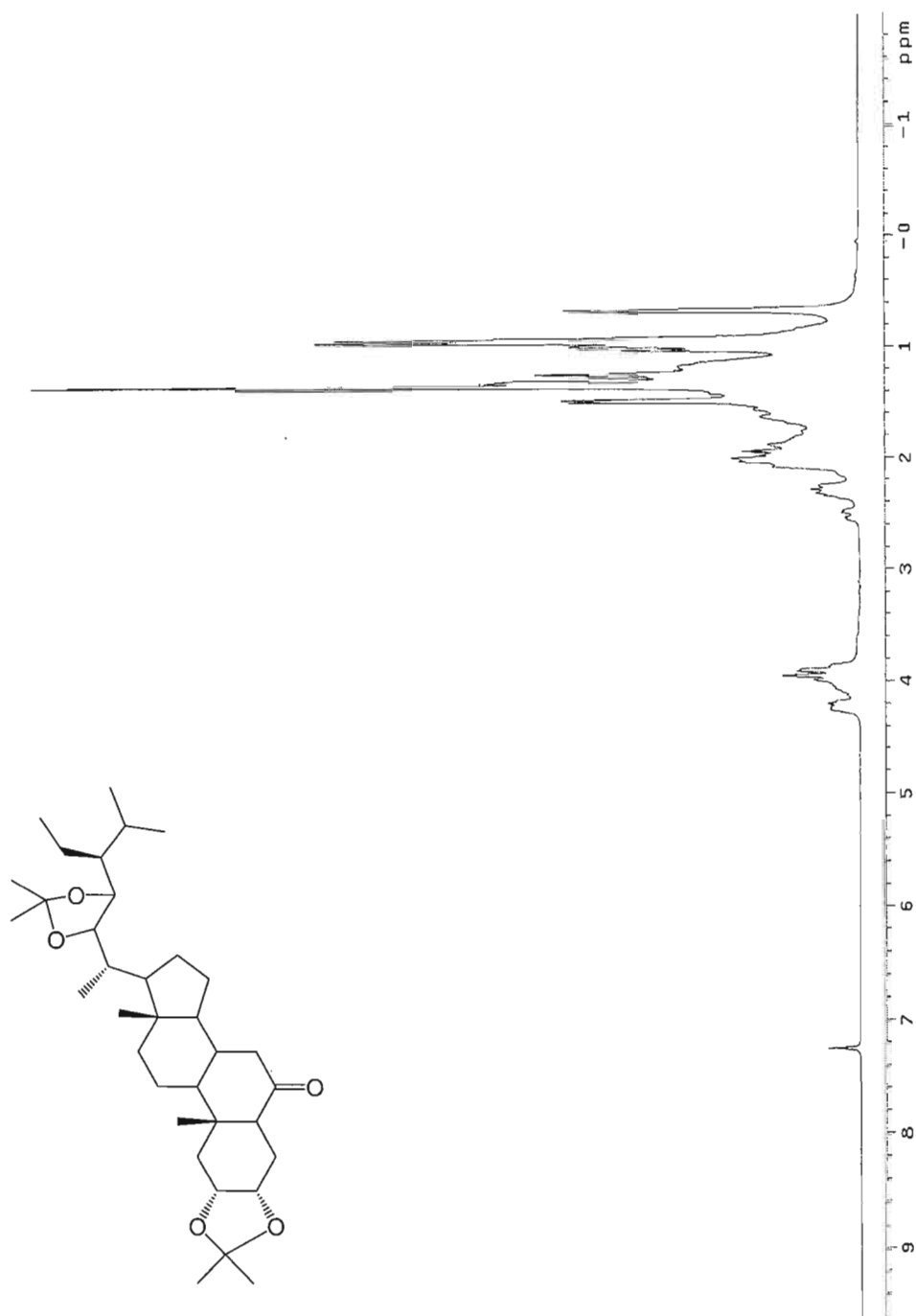
(22*E*, 24*S*)-stigmasta-2,22-dien-6-one (**27**)



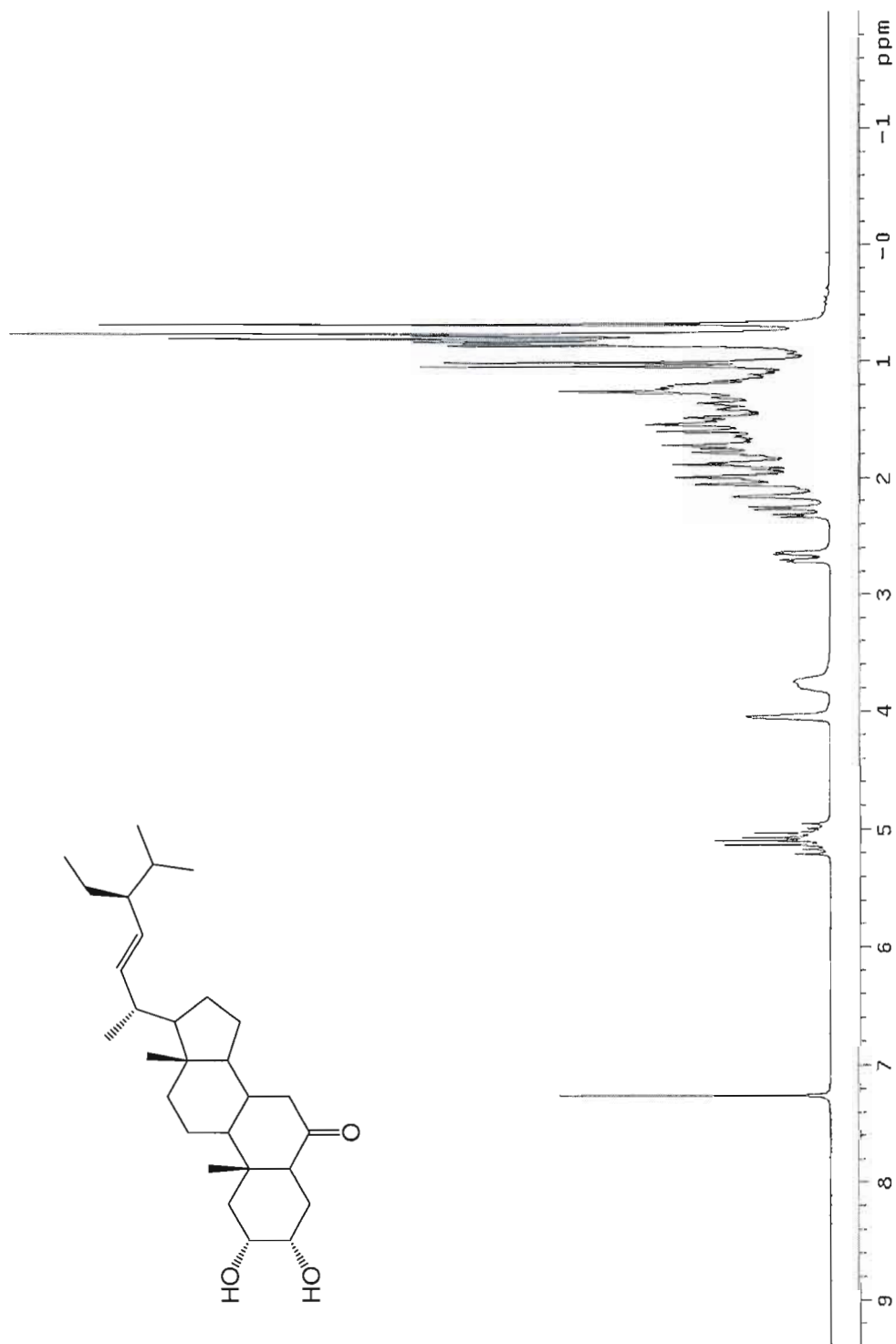
(22*R*, 23*R*, 24*S*)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 22, 23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**24a**) et son isomère 22(*S*), 23(*S*) (**24b**)



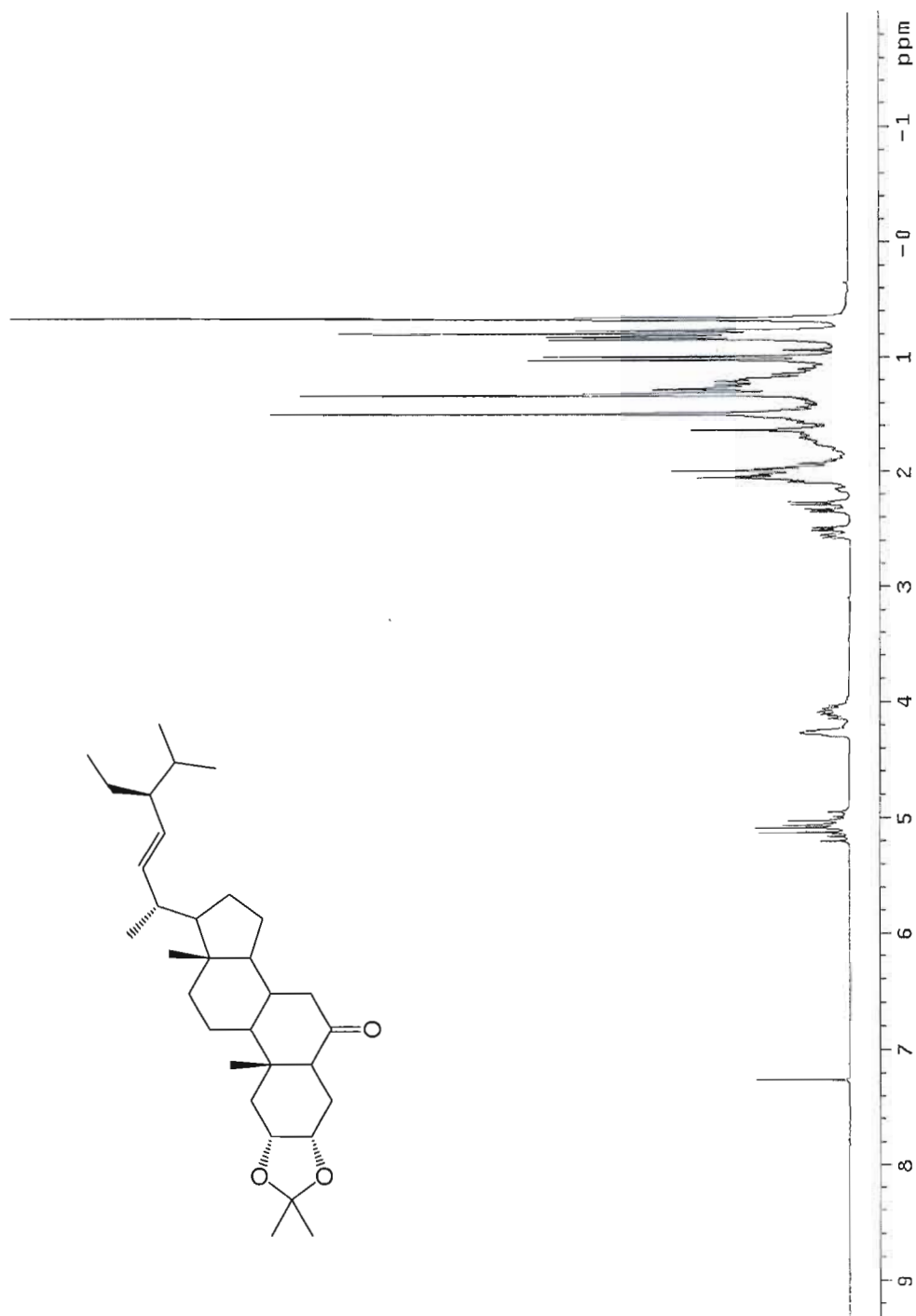
(24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3,22,23-diacétonide (**48**)



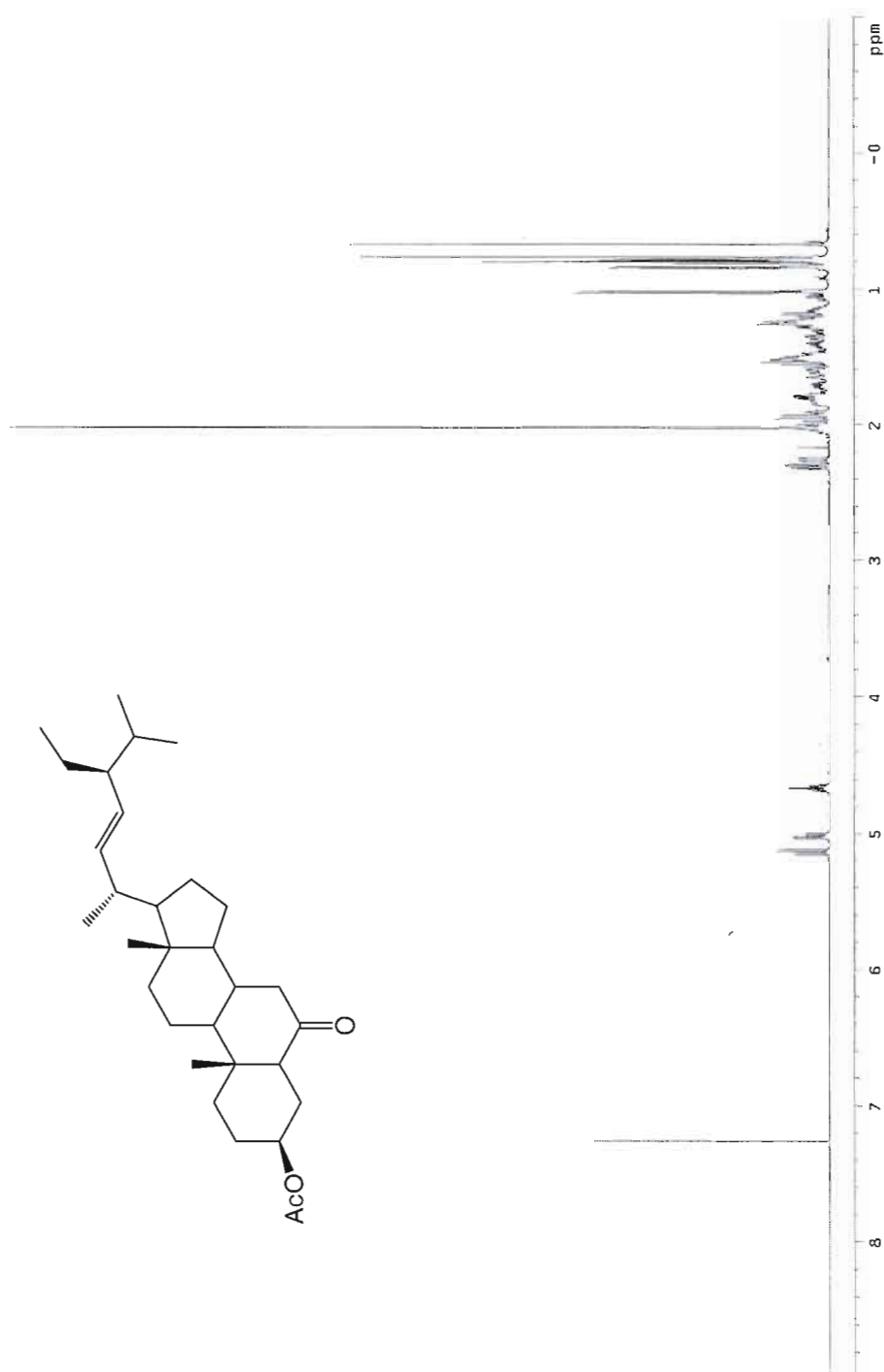
(22*E*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**53**)



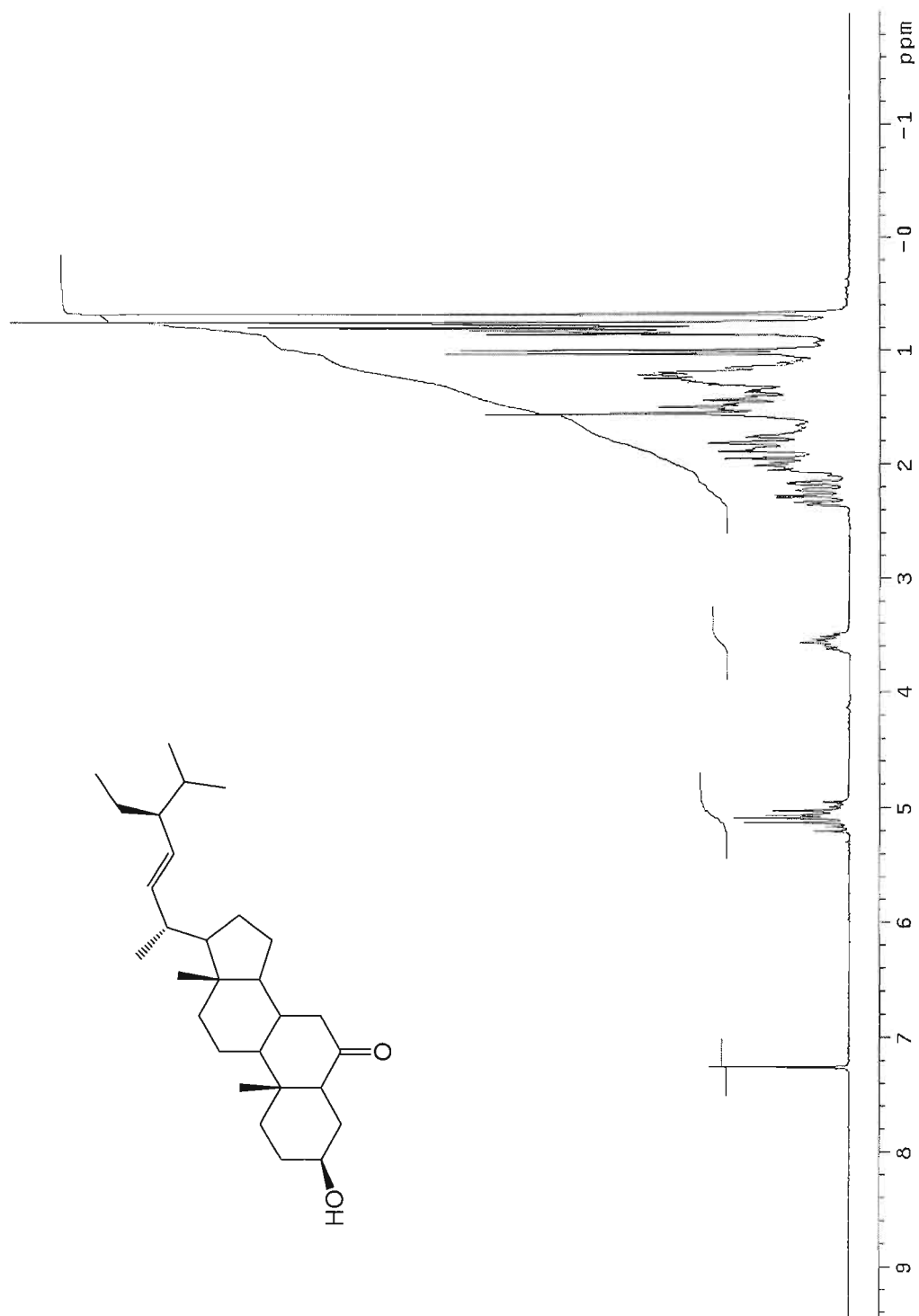
(22*E*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3-acetonide (**54**)



(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -acétoxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**55**)

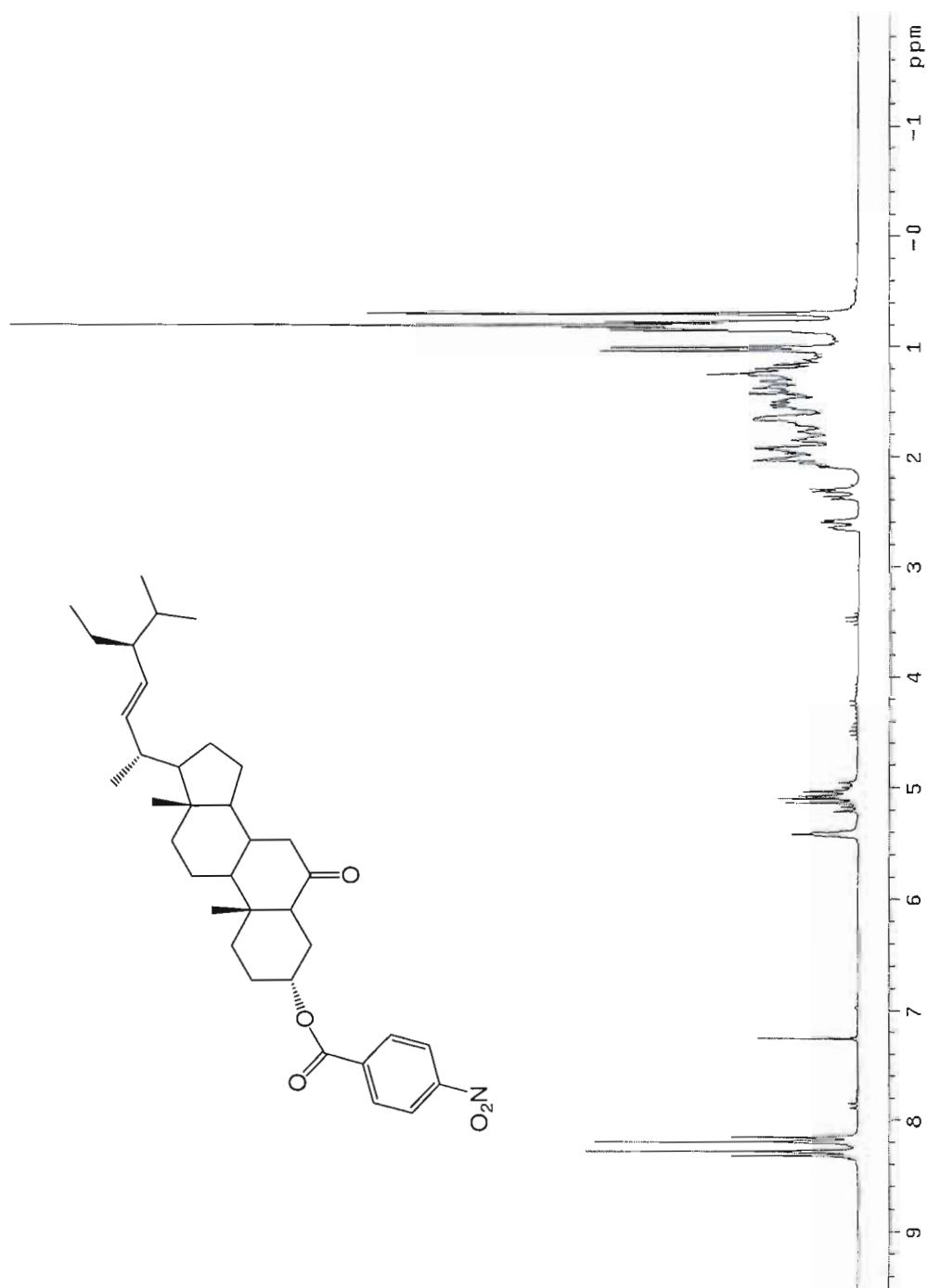


(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**33**)

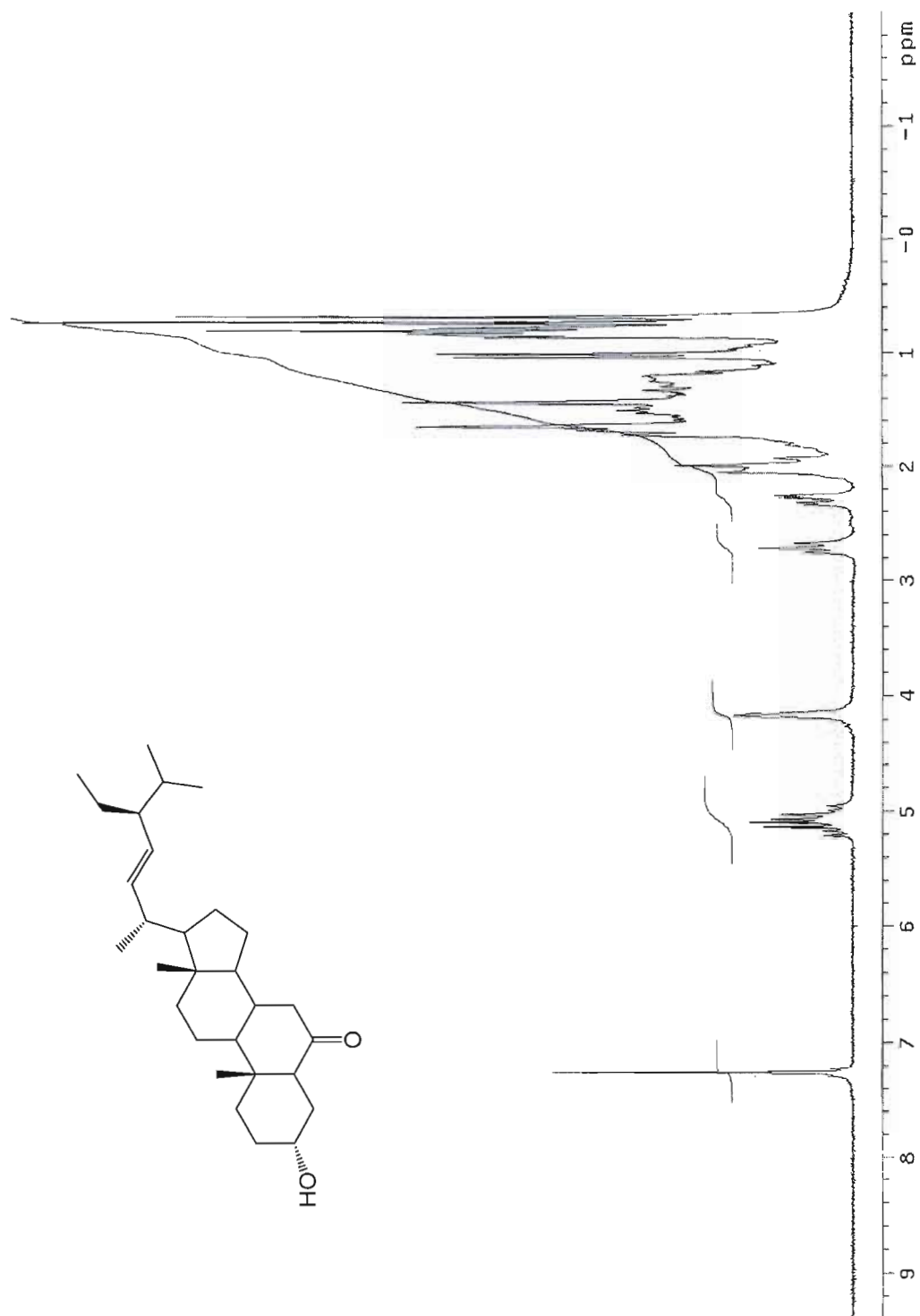




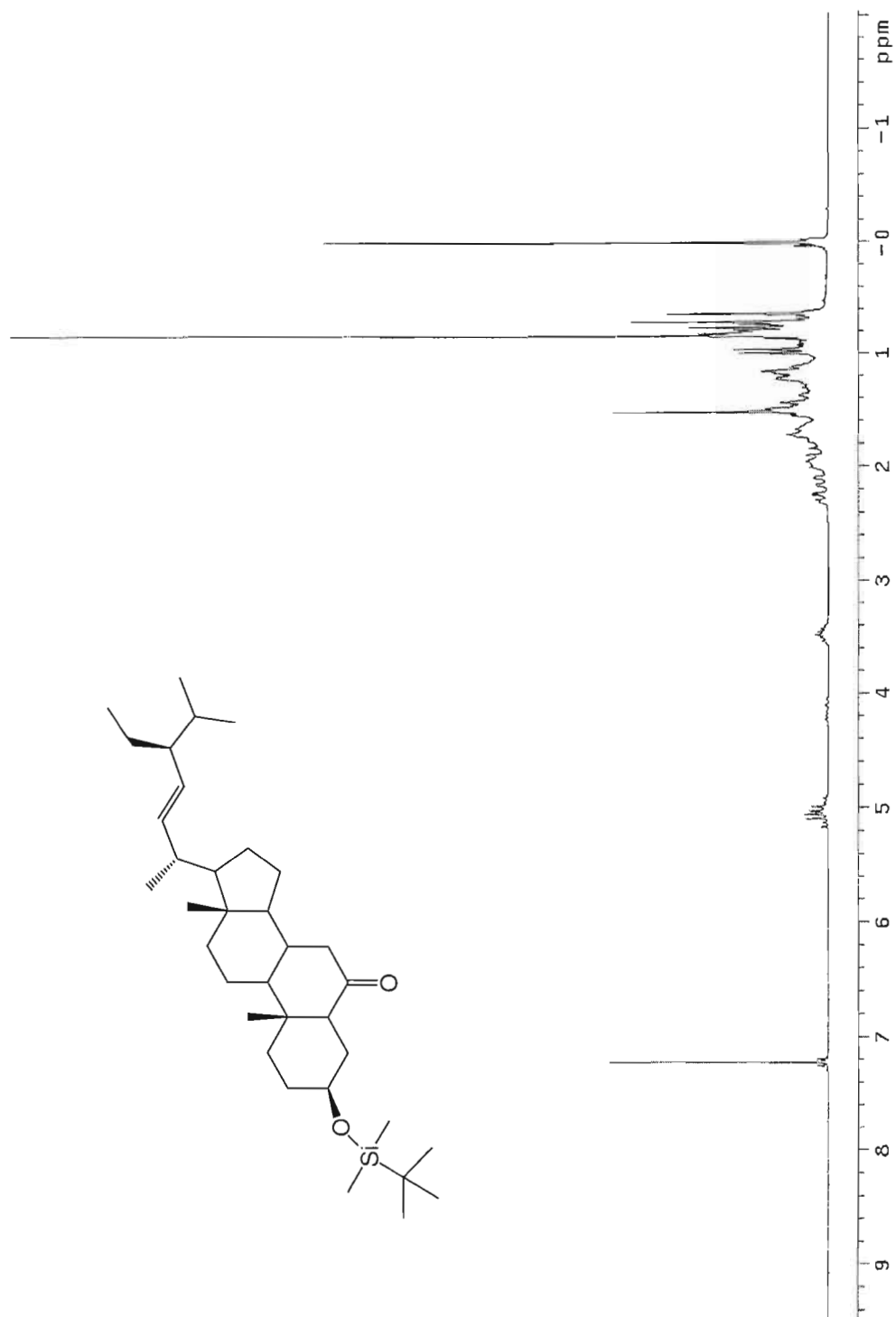
(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -(4-nitrobenzoyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**60**)



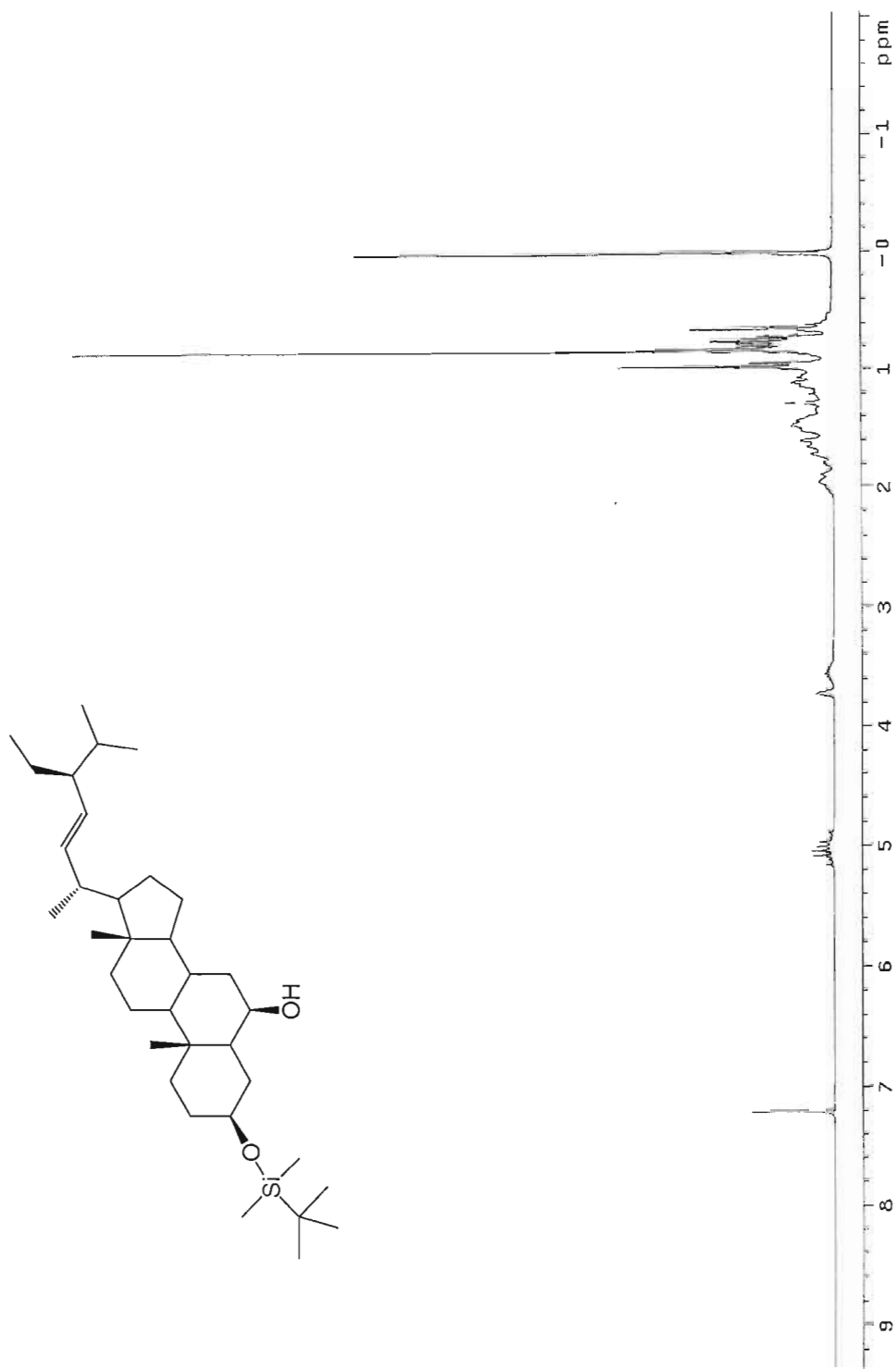
(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**36**)



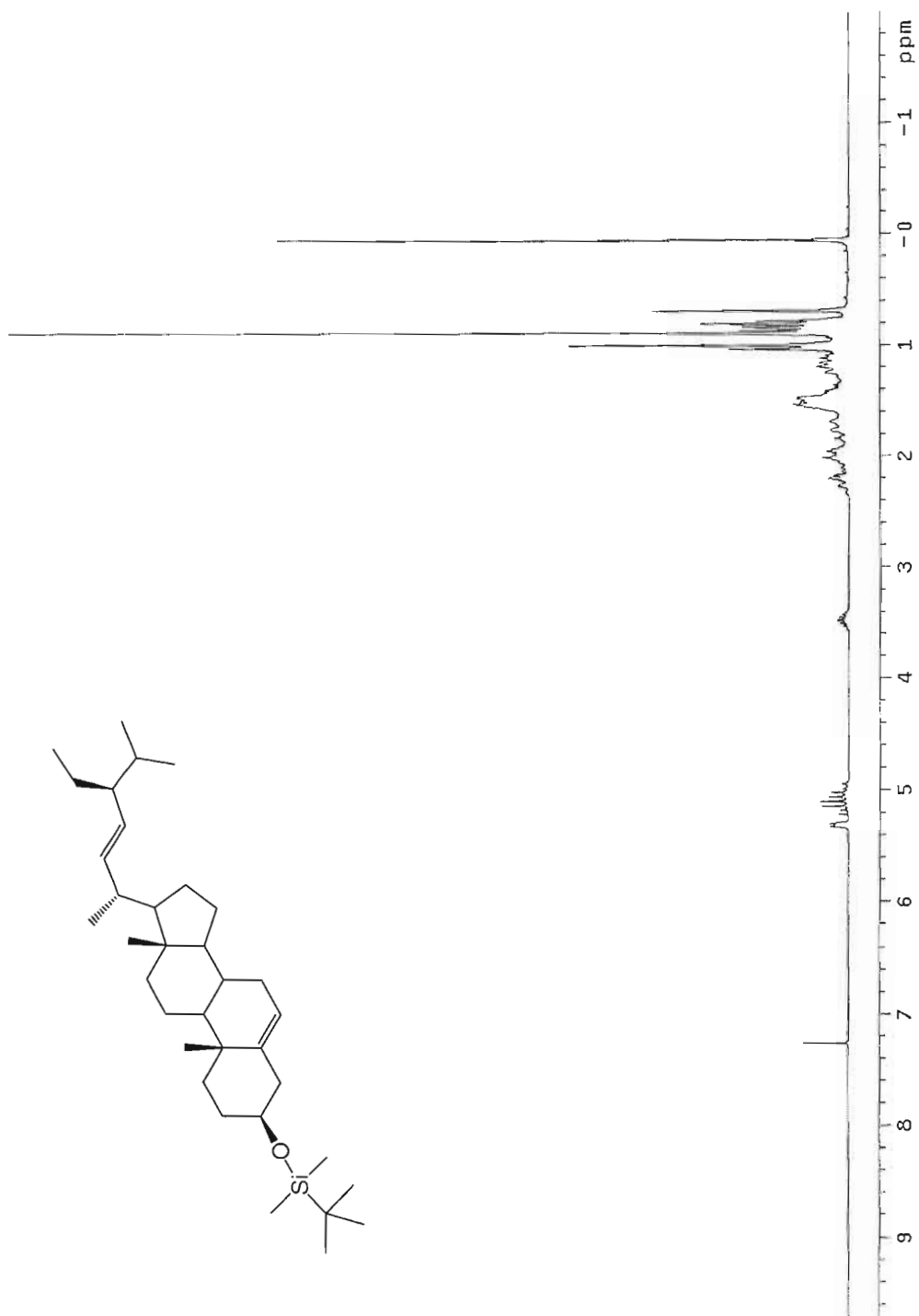
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one  
(62)



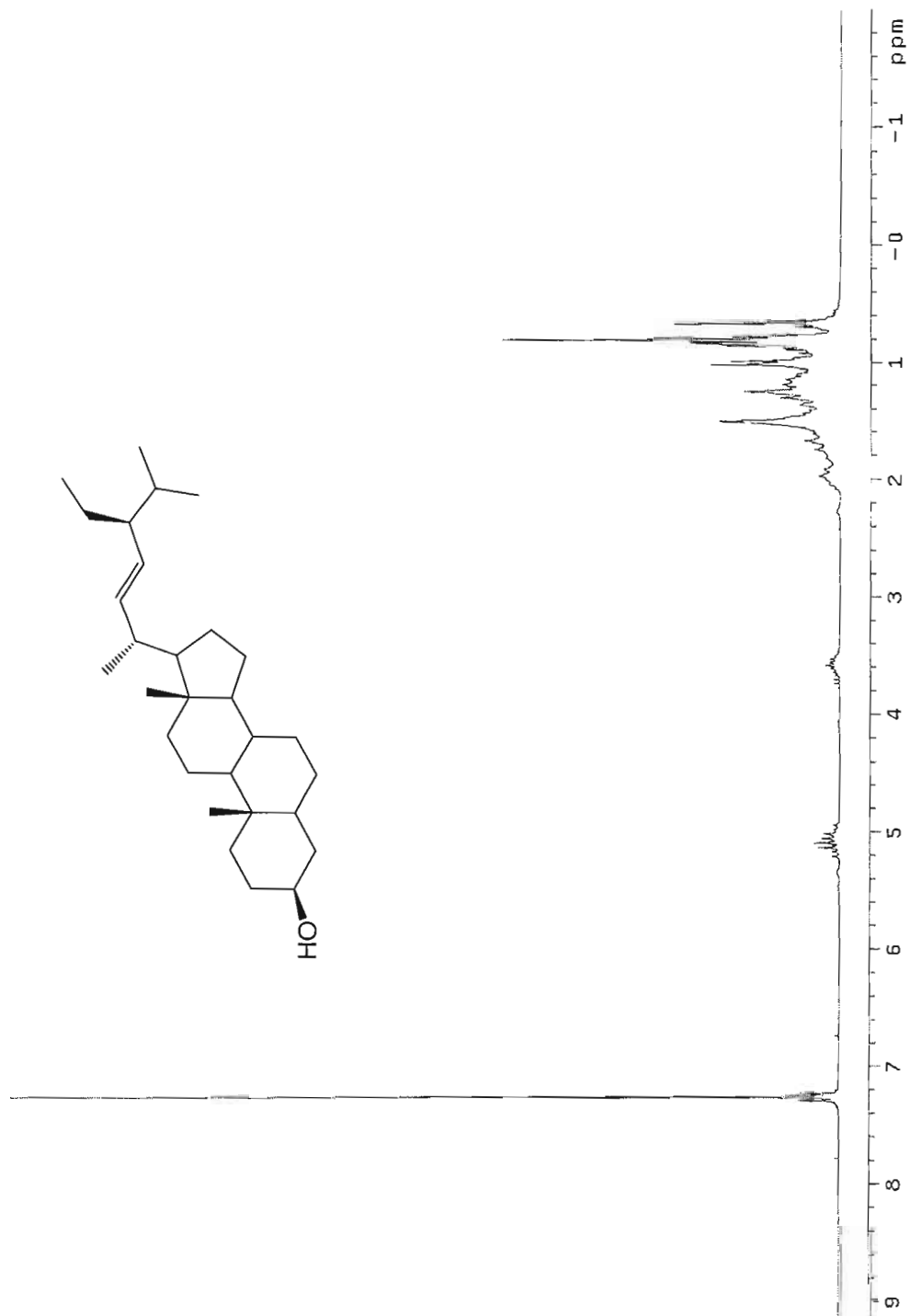
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol  
(63)



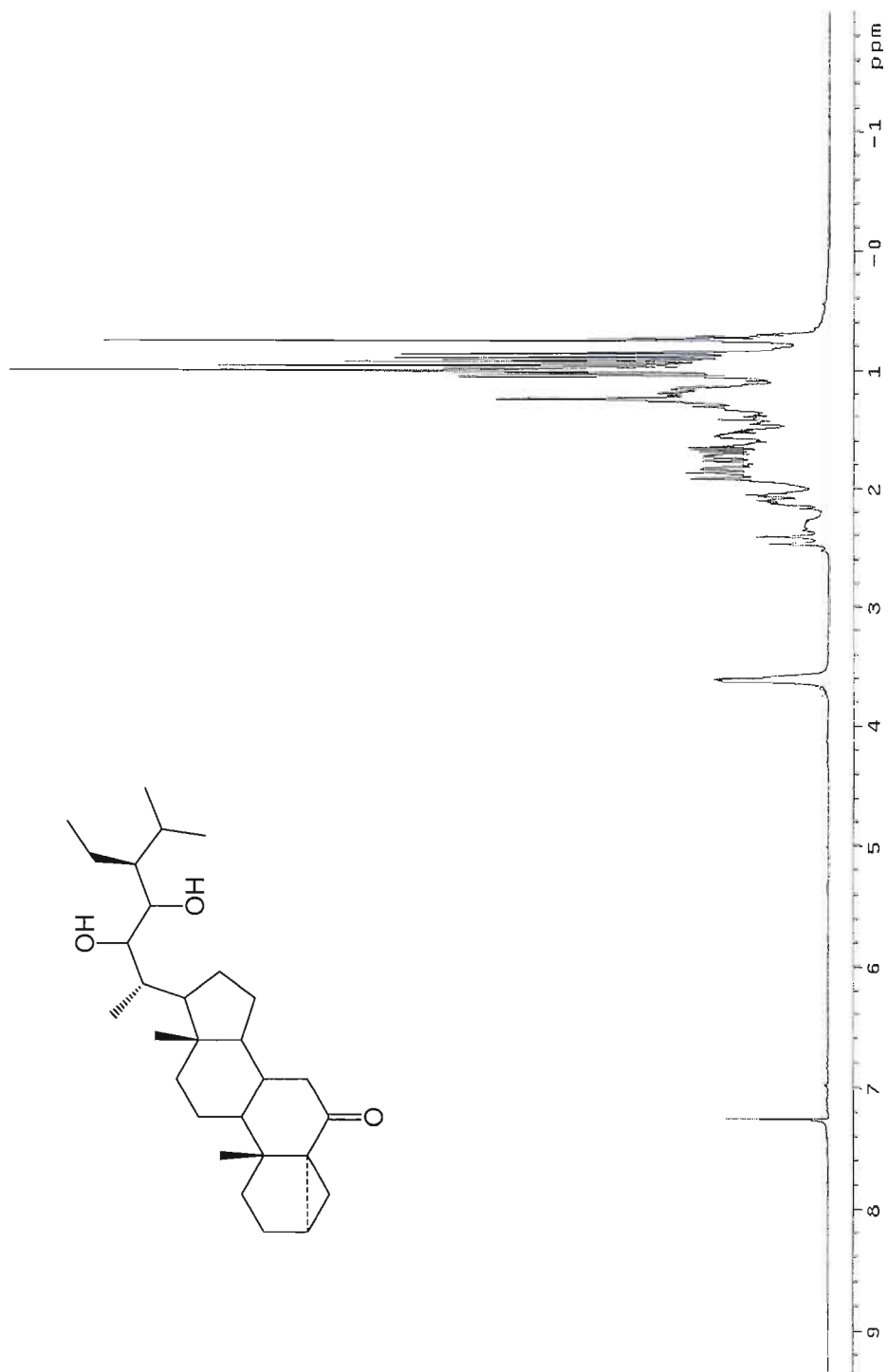
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-stigmasta-5,22-diene (**65**)



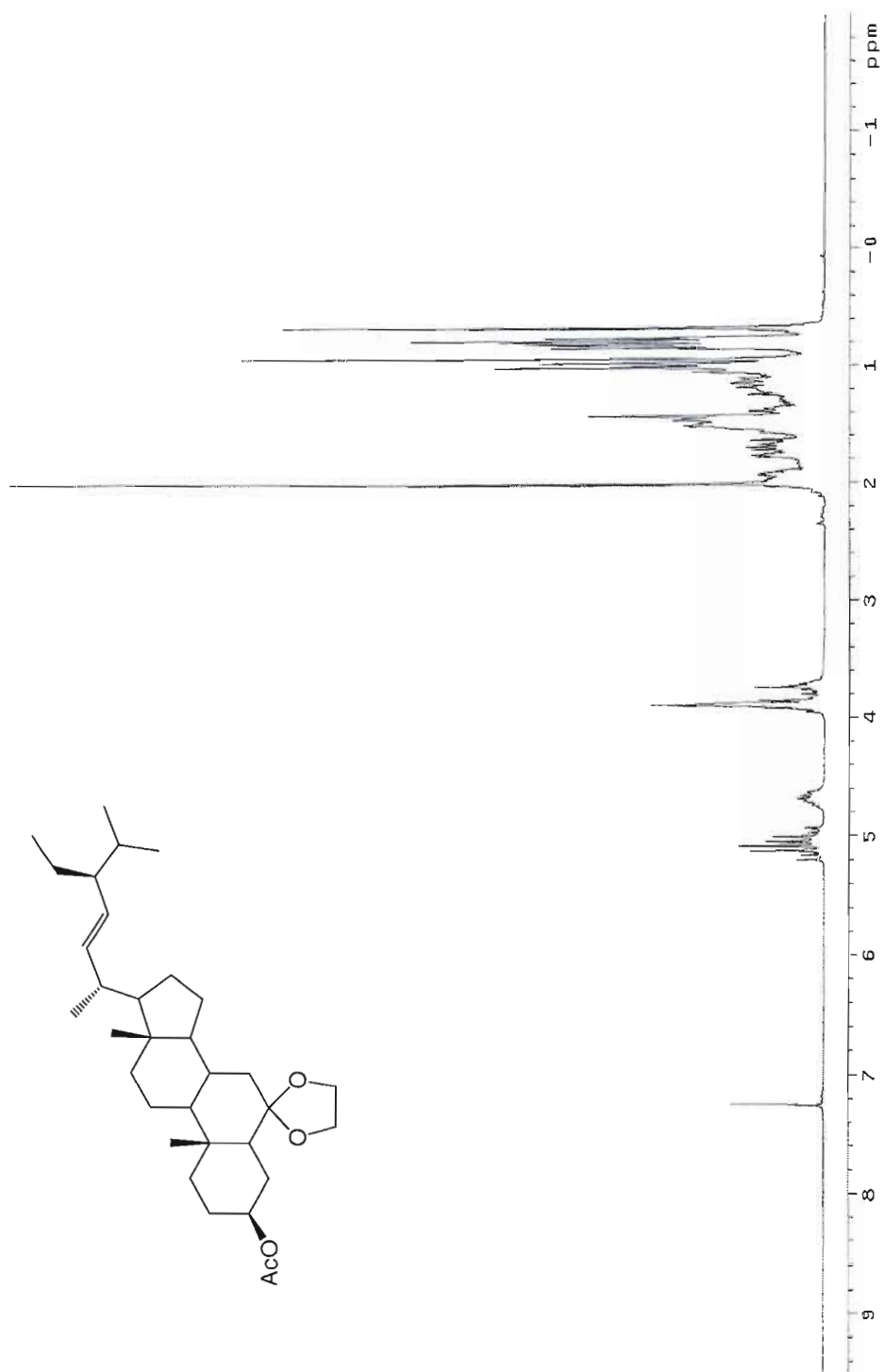
(22*E*, 24*S*)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (**34**)



(22*E*, 24*S*)-22,23-dihydroxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmastan-6-one (**72**)

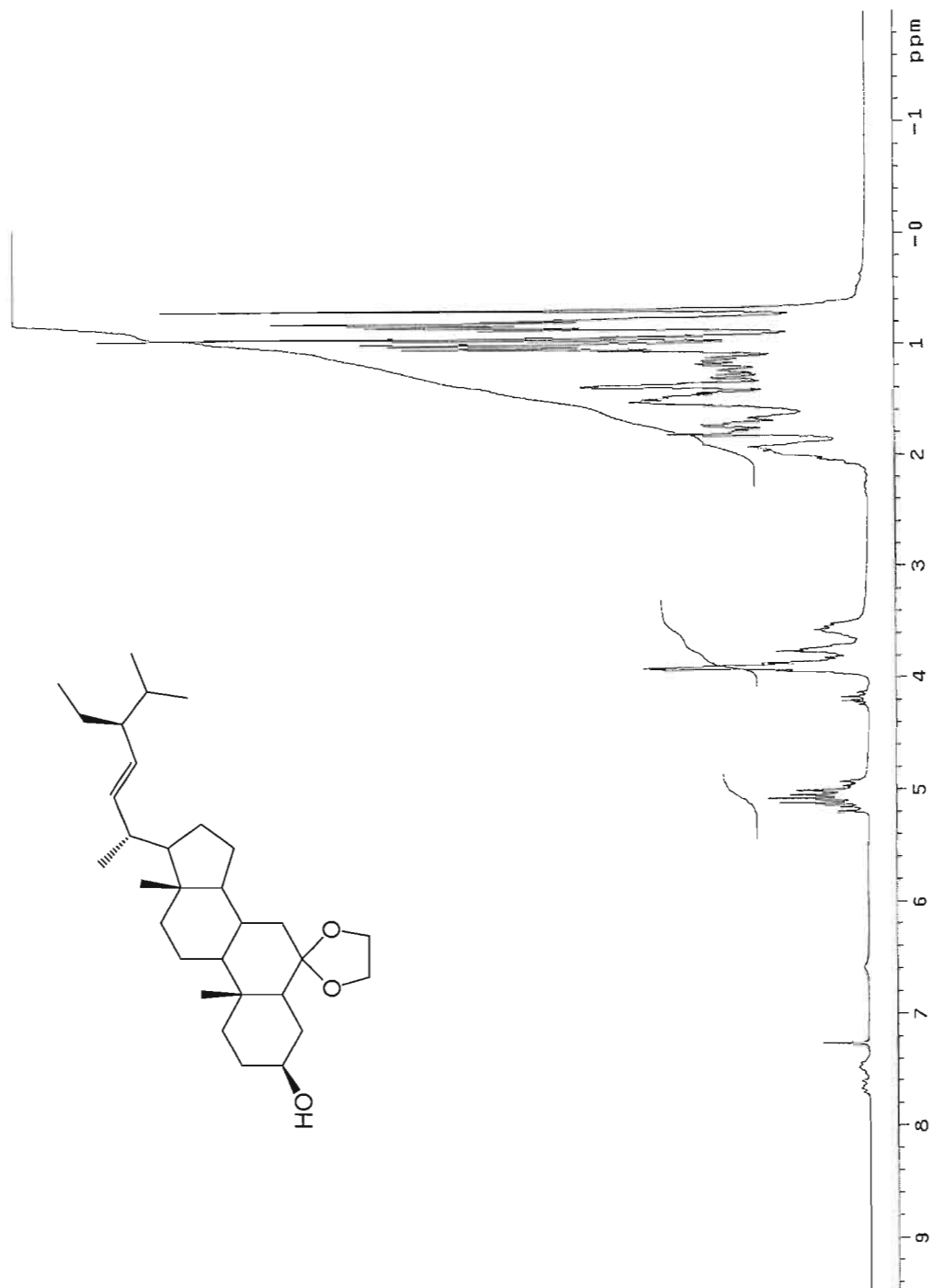


(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -acétoxy-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene (**77**)

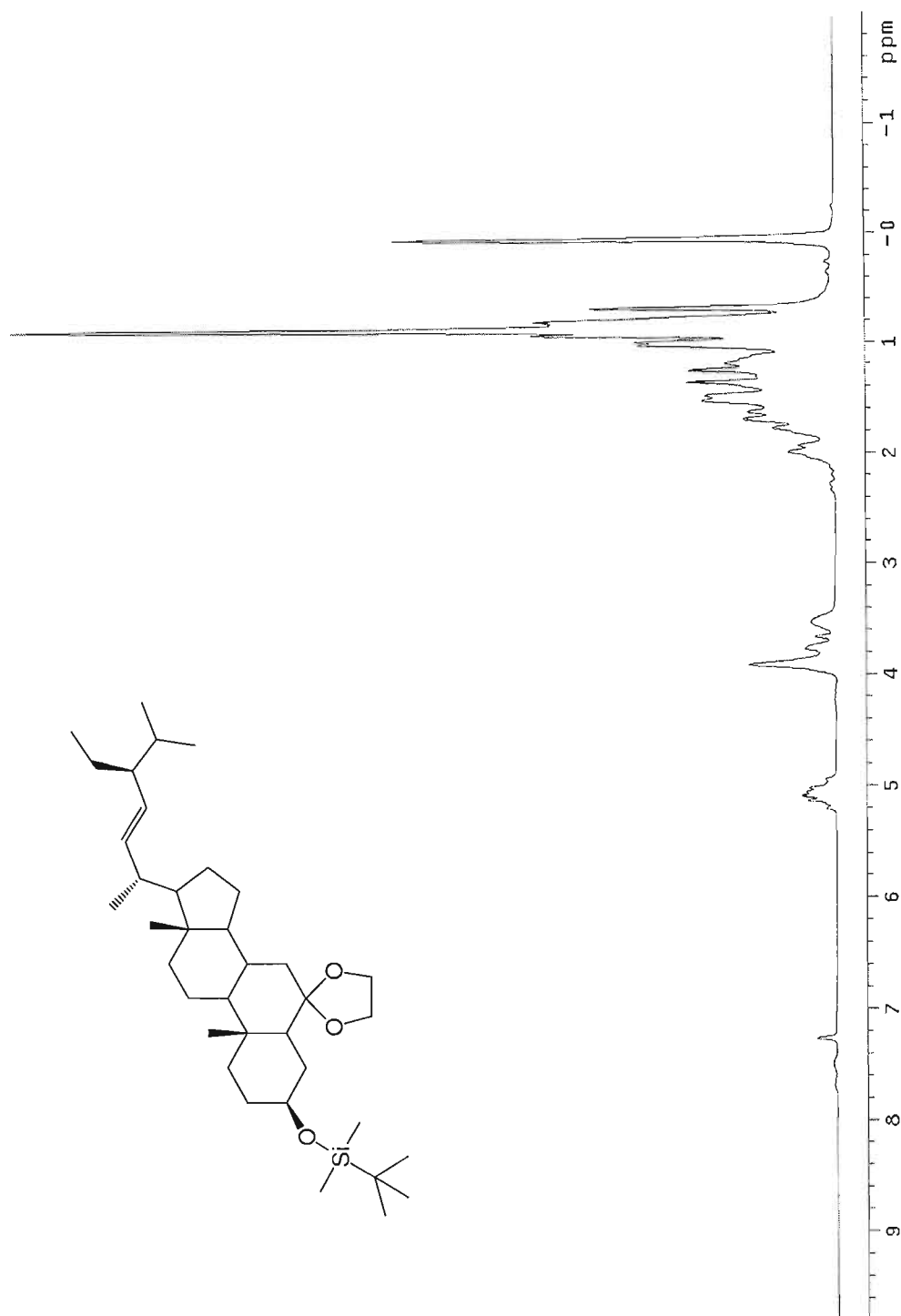




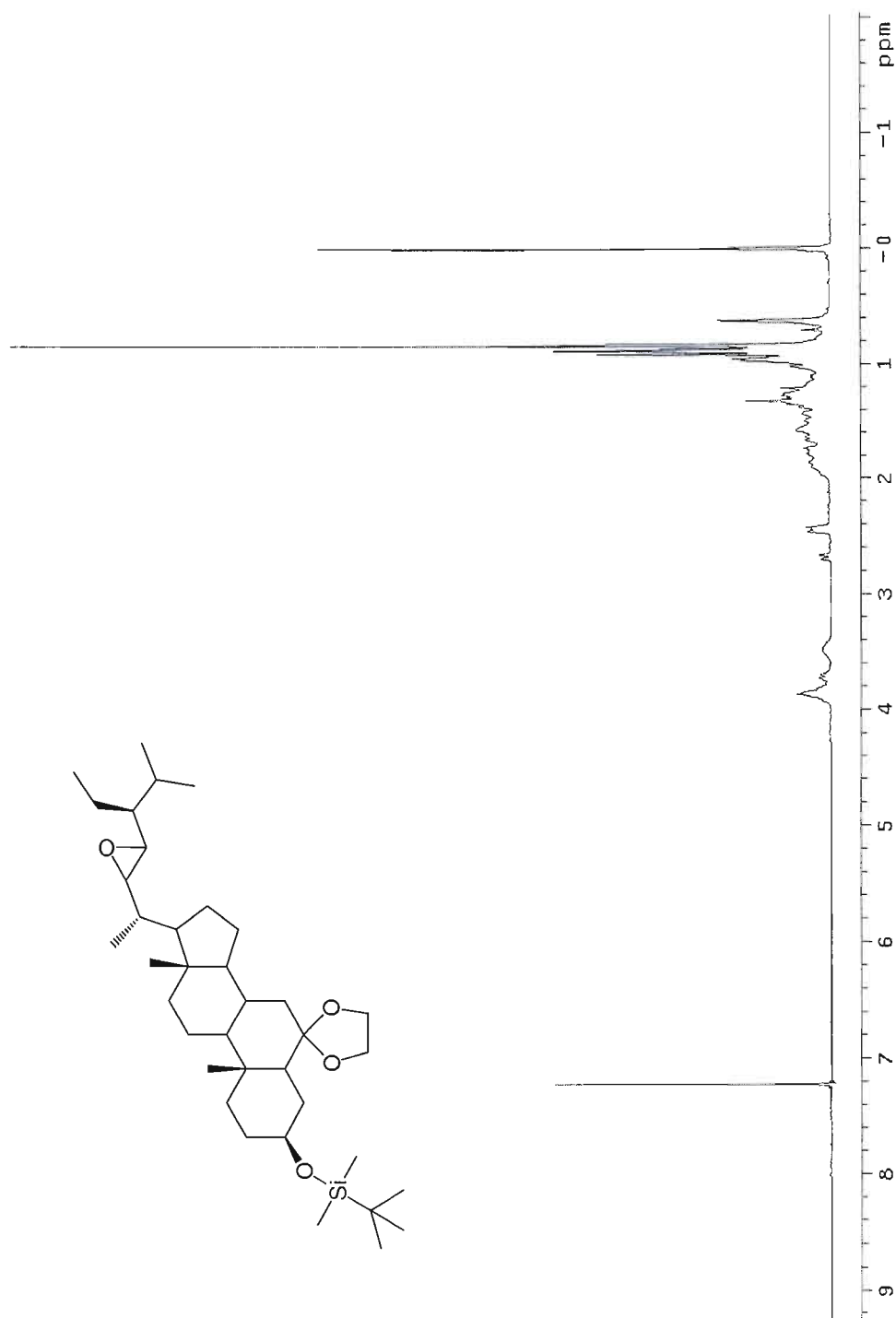
(22*E*, 24*S*)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (**78**)



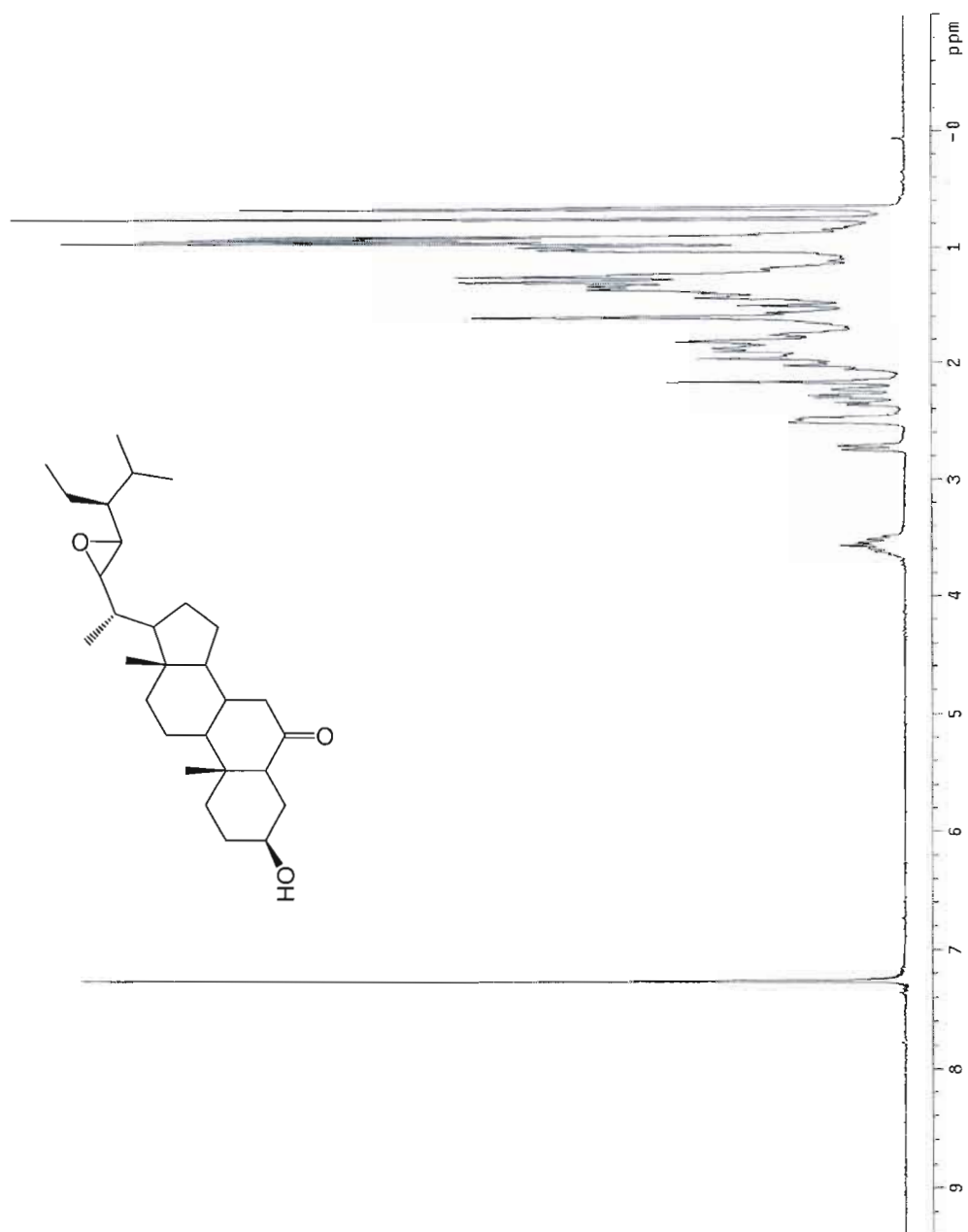
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene (**79**)



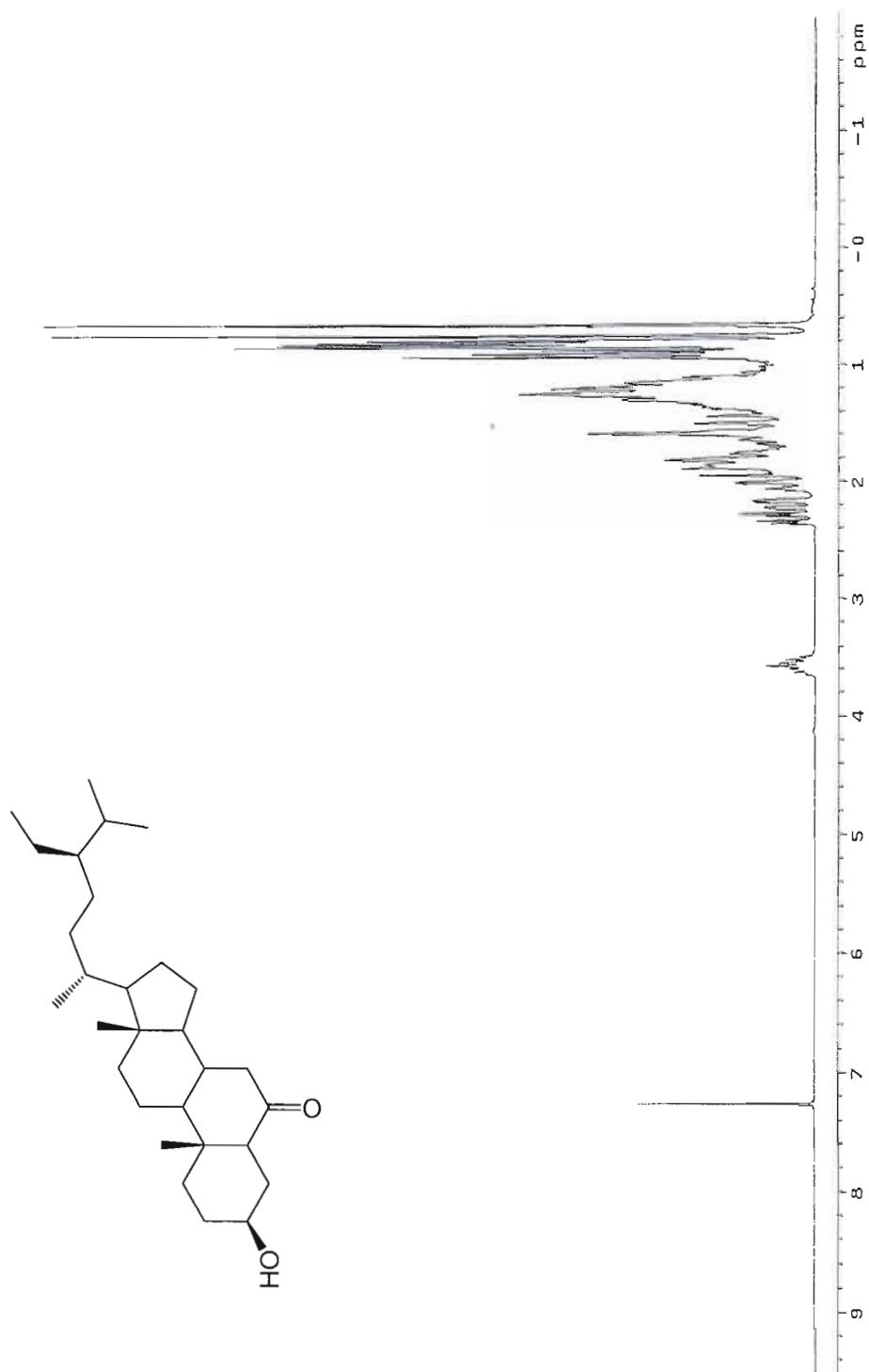
(24*S*)-3 $\beta$ -(1,1dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastane (**80**)



(24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**75**)



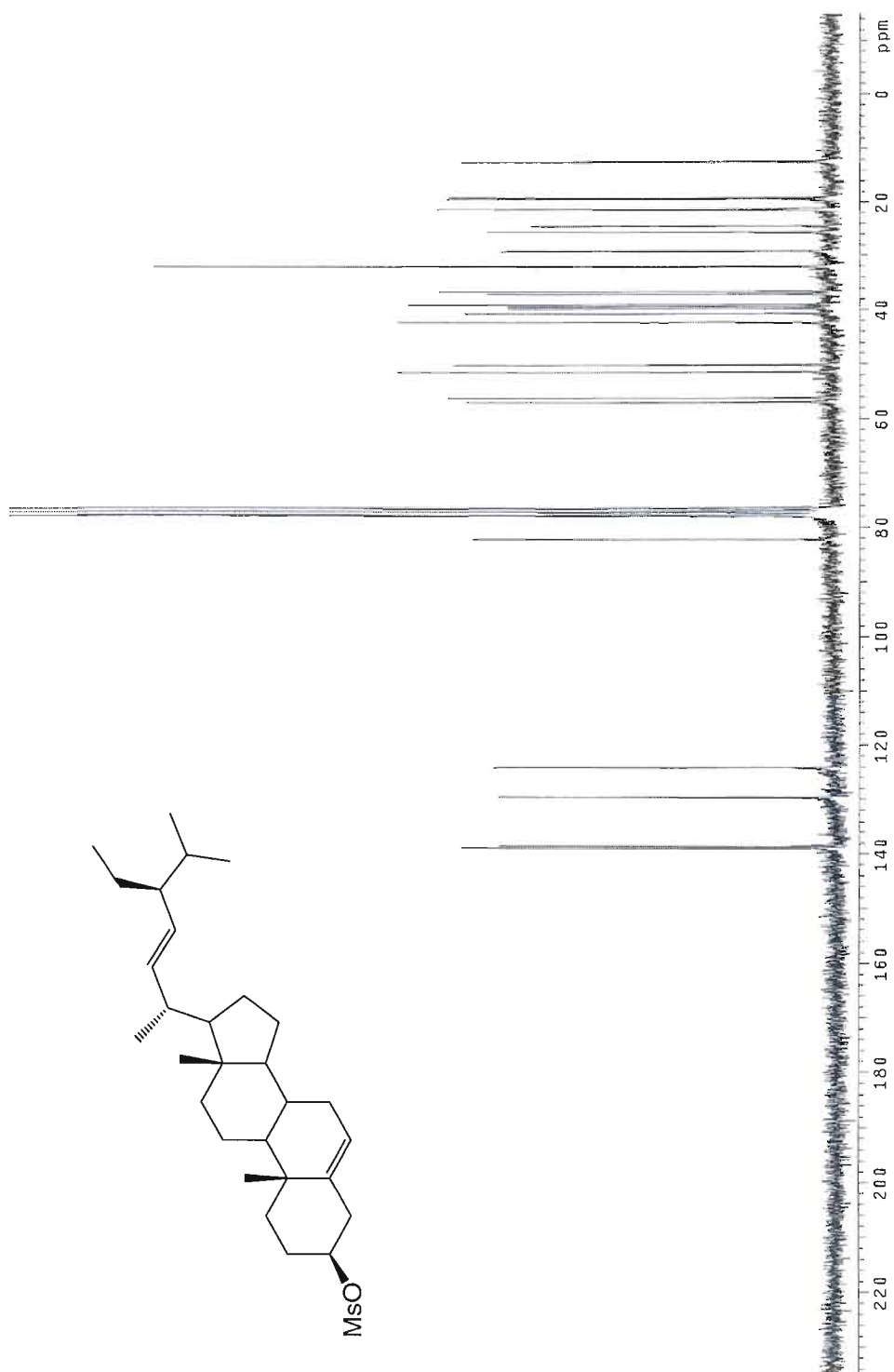
(24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**81**)



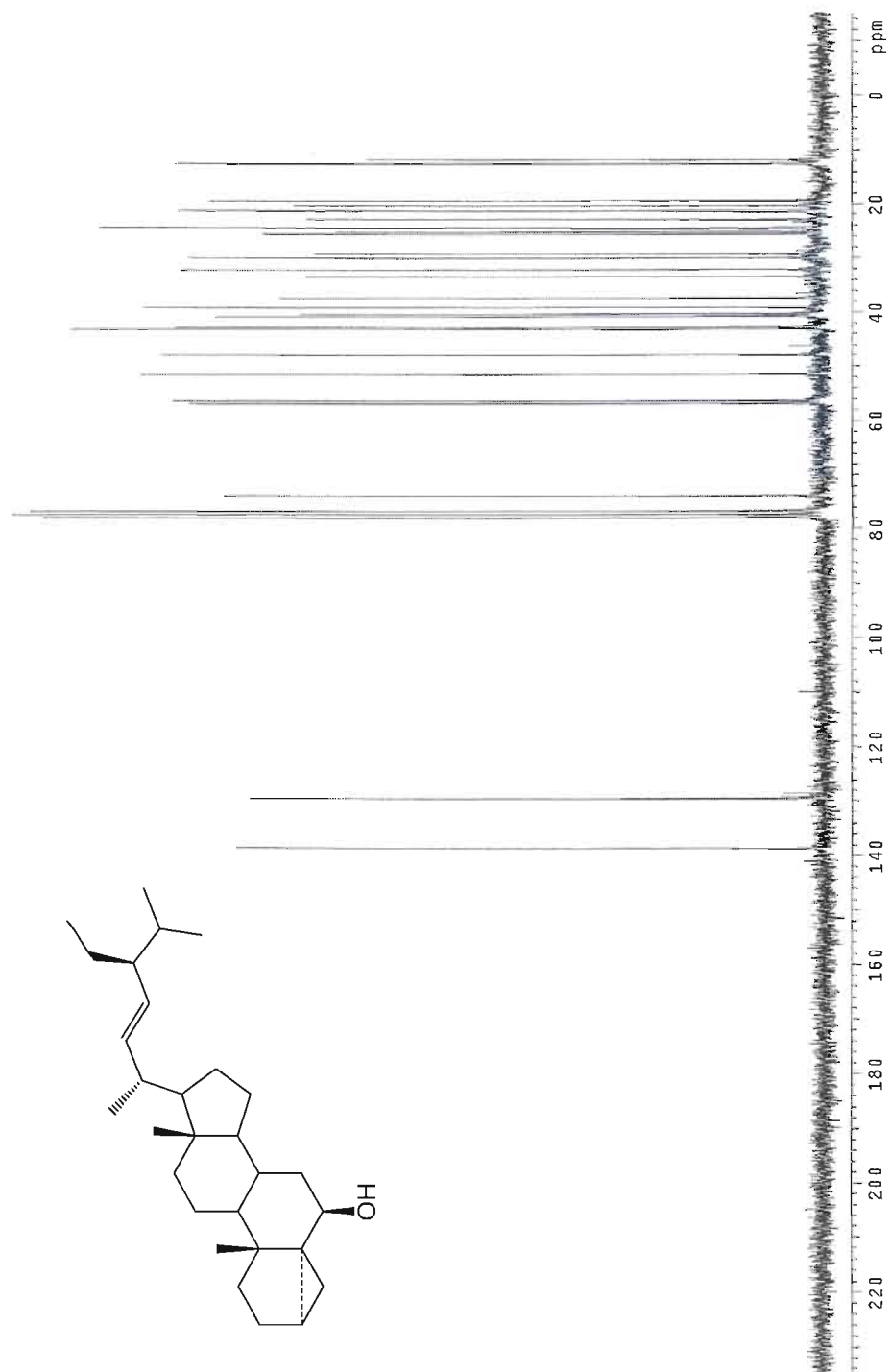
## **APPENDICE B**

### **SPECTRES RMN $^{13}\text{C}$**

(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(methylsulfonyloxy)-stigmasta-5,22-diene (**47**)

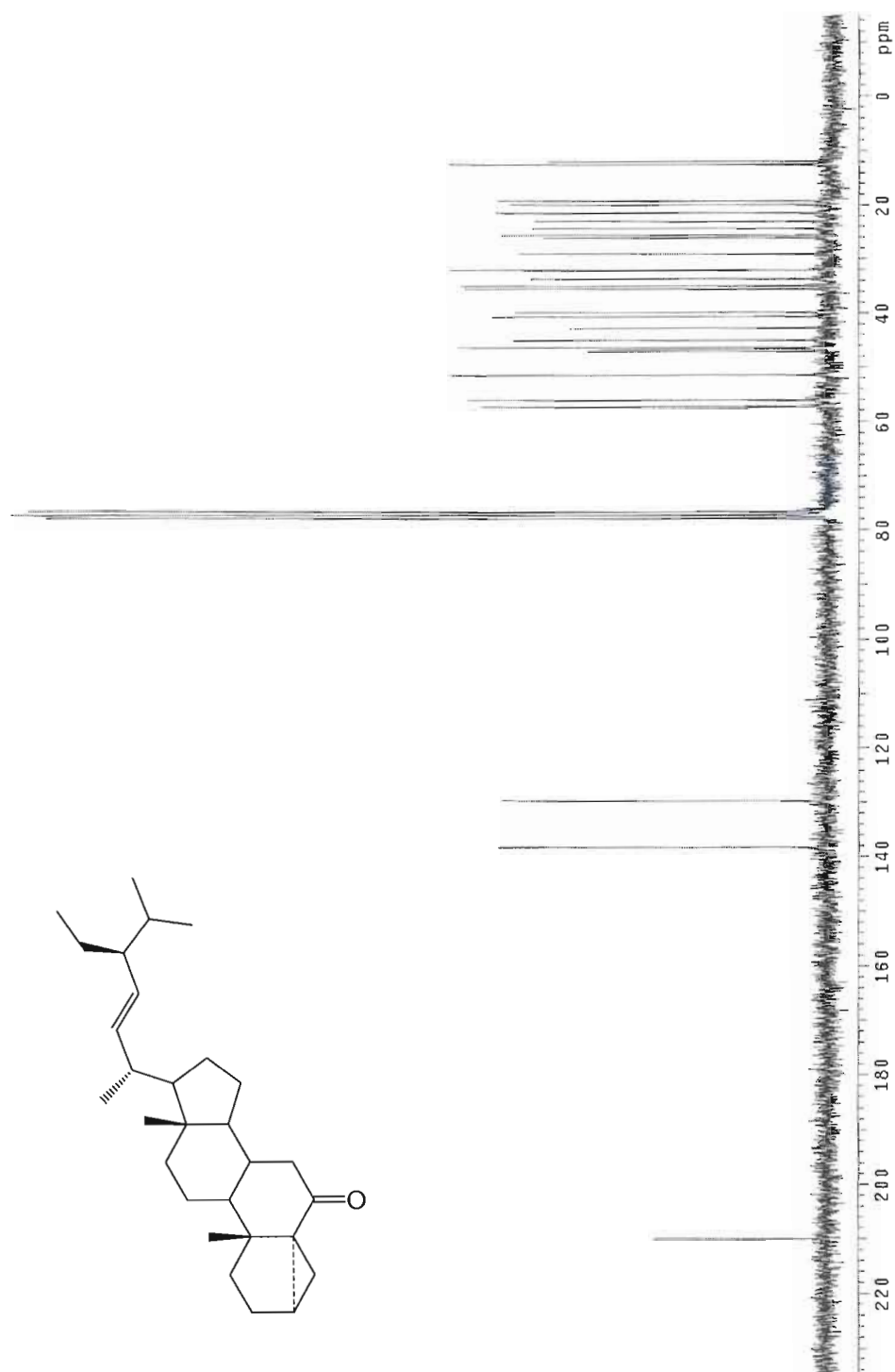


(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol (**31**)

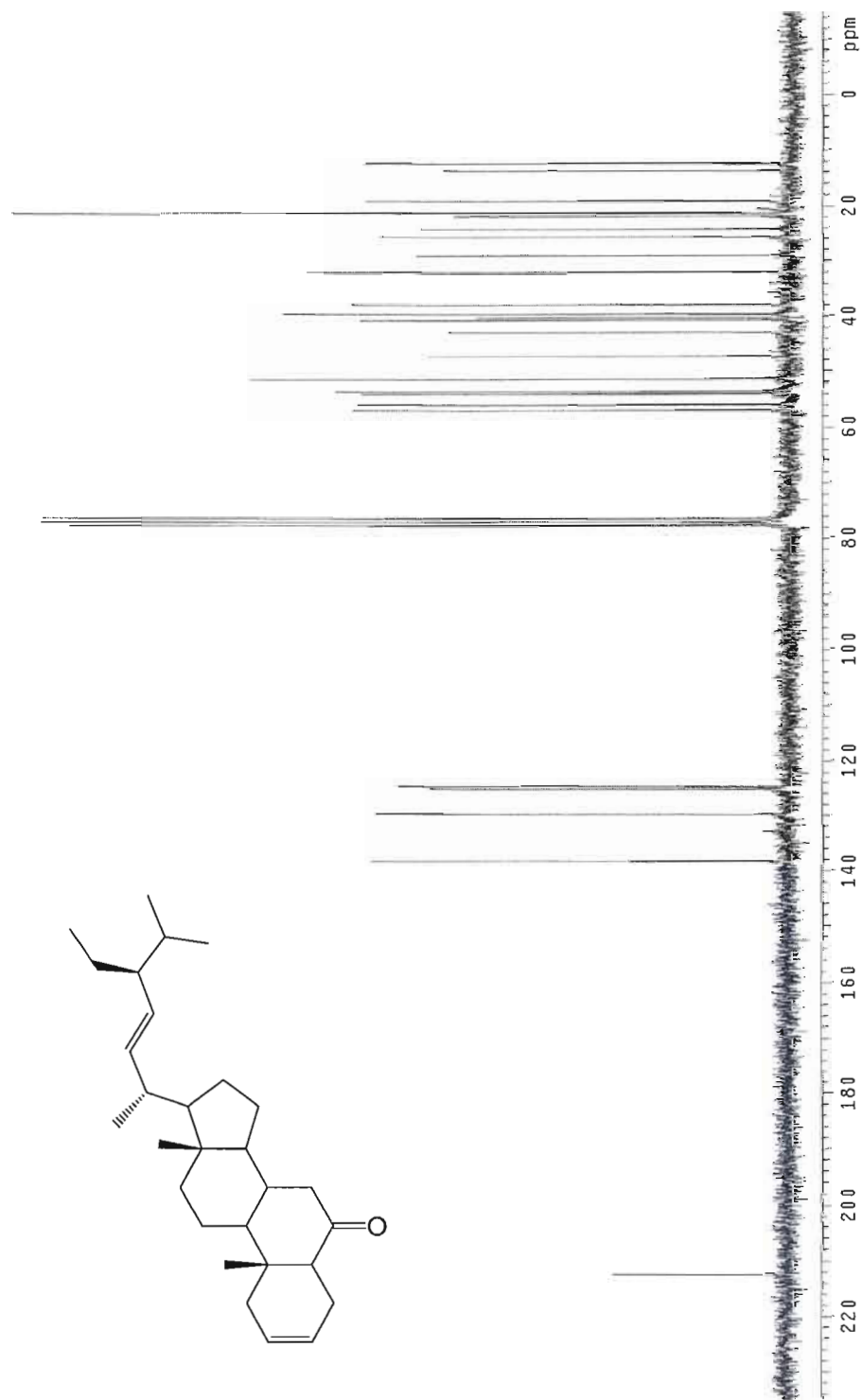


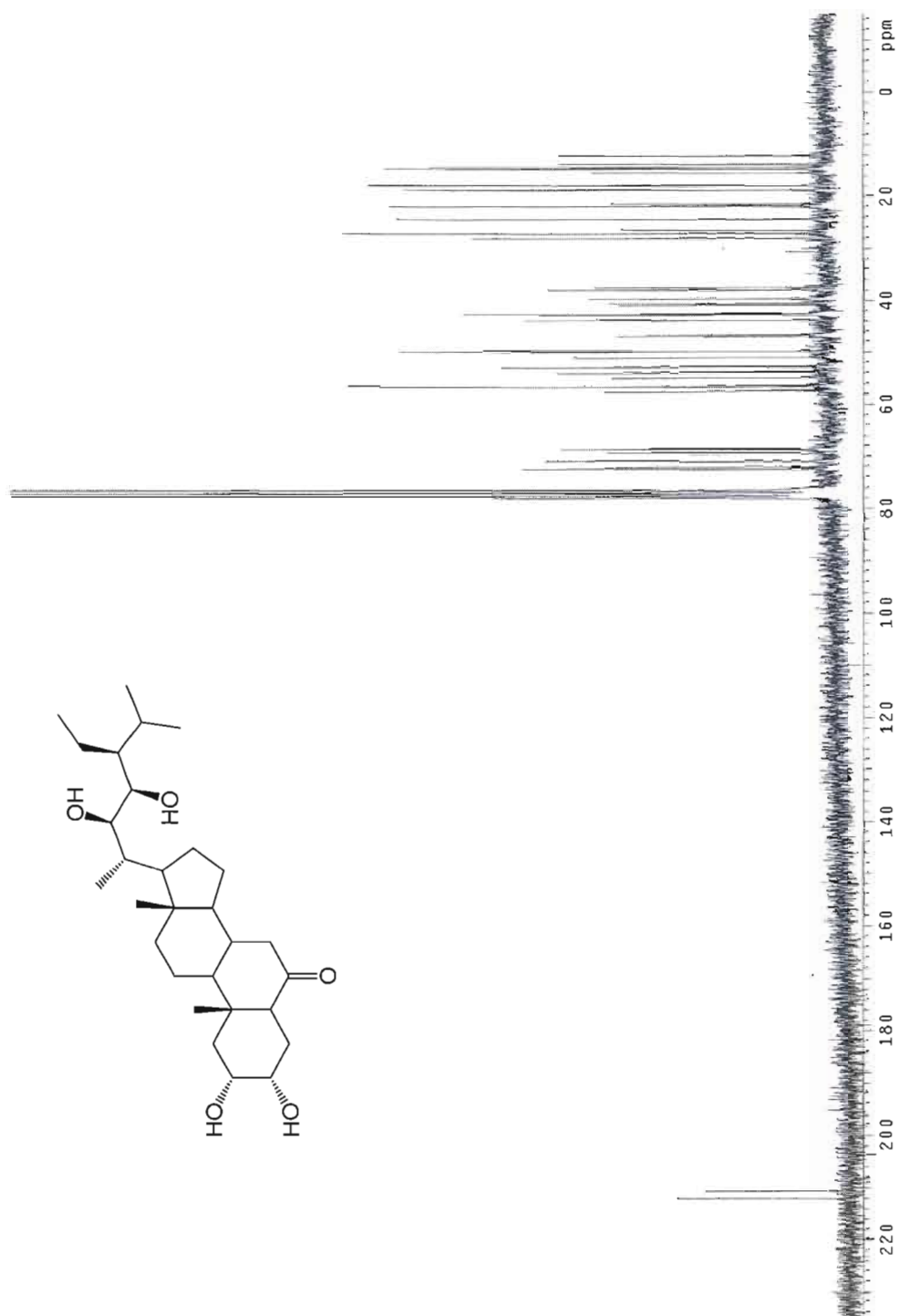


(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ ,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one (**28**)

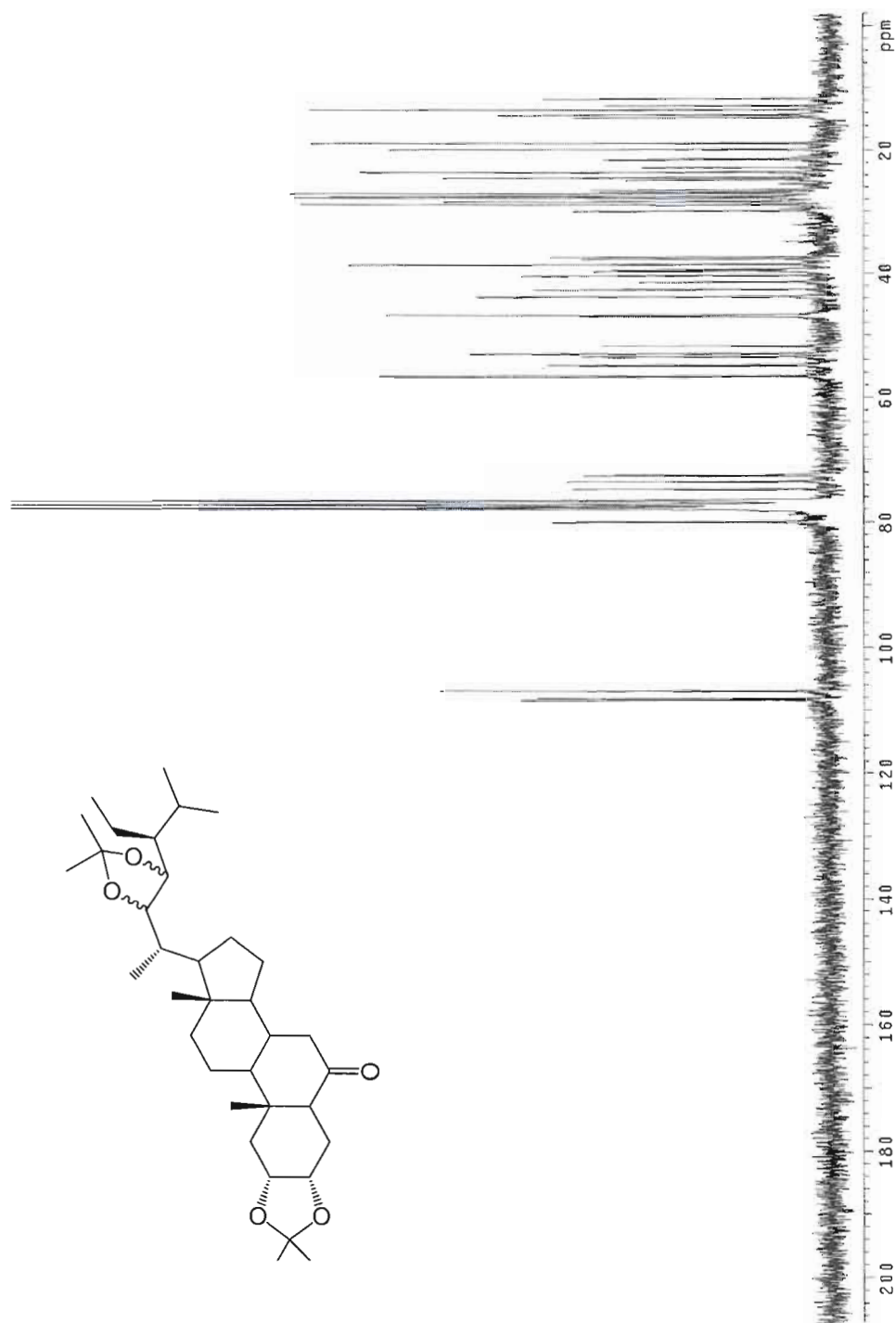


(22*E*, 24*S*)-stigmasta-2,22-dien-6-one (**27**)

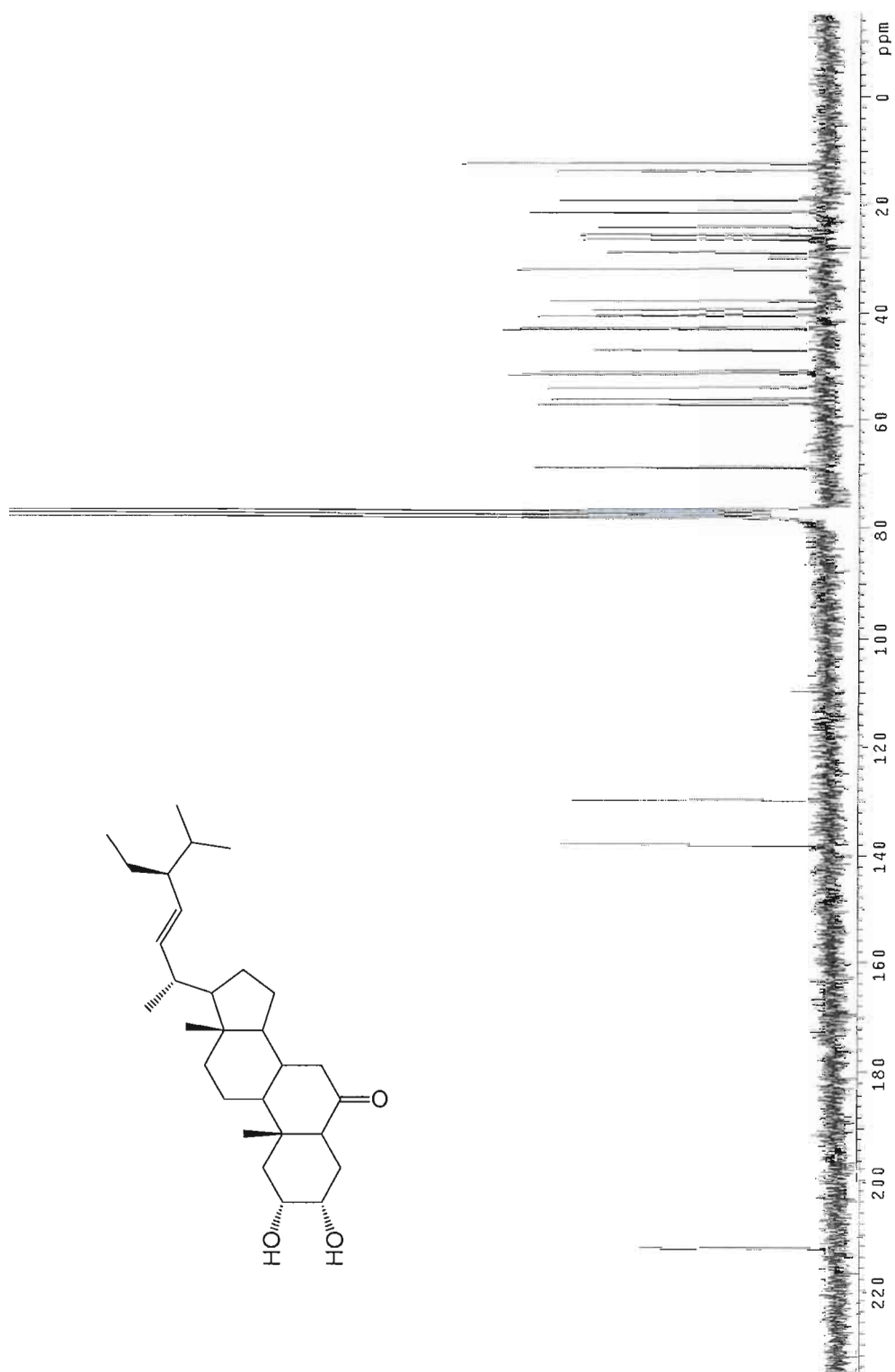




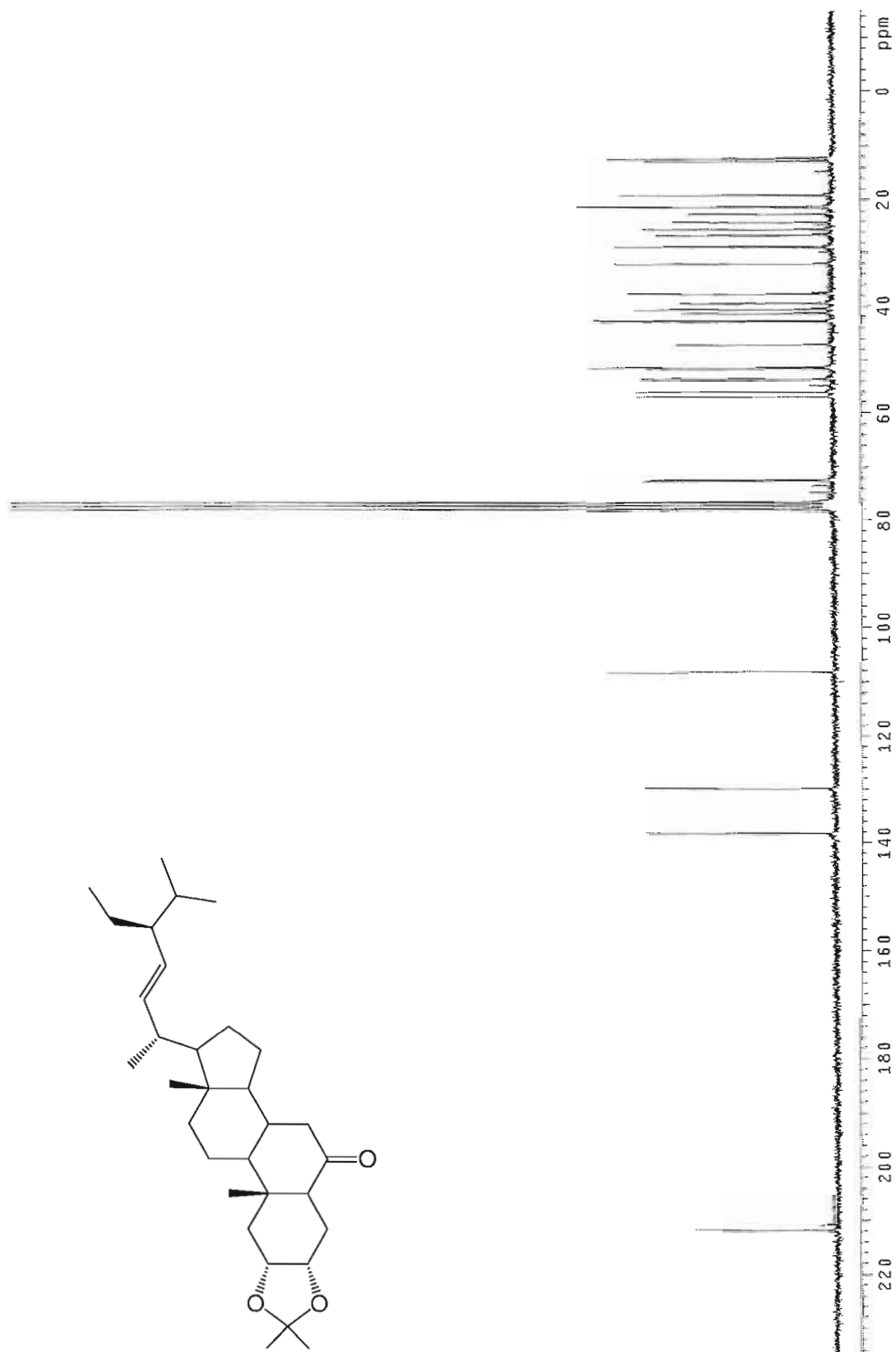
(24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3,22,23-diacetonide (**48**)



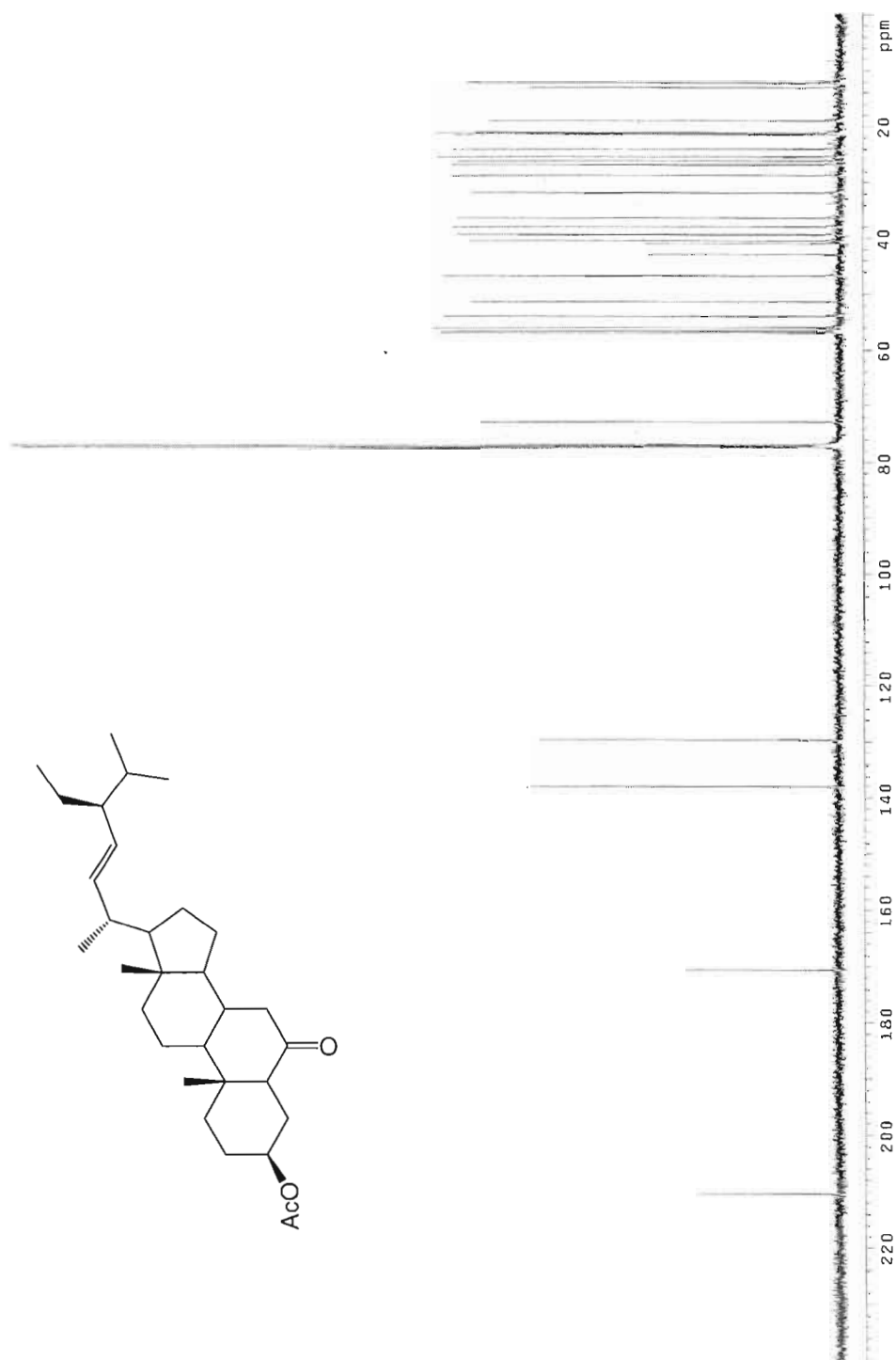
(22*E*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**53**)



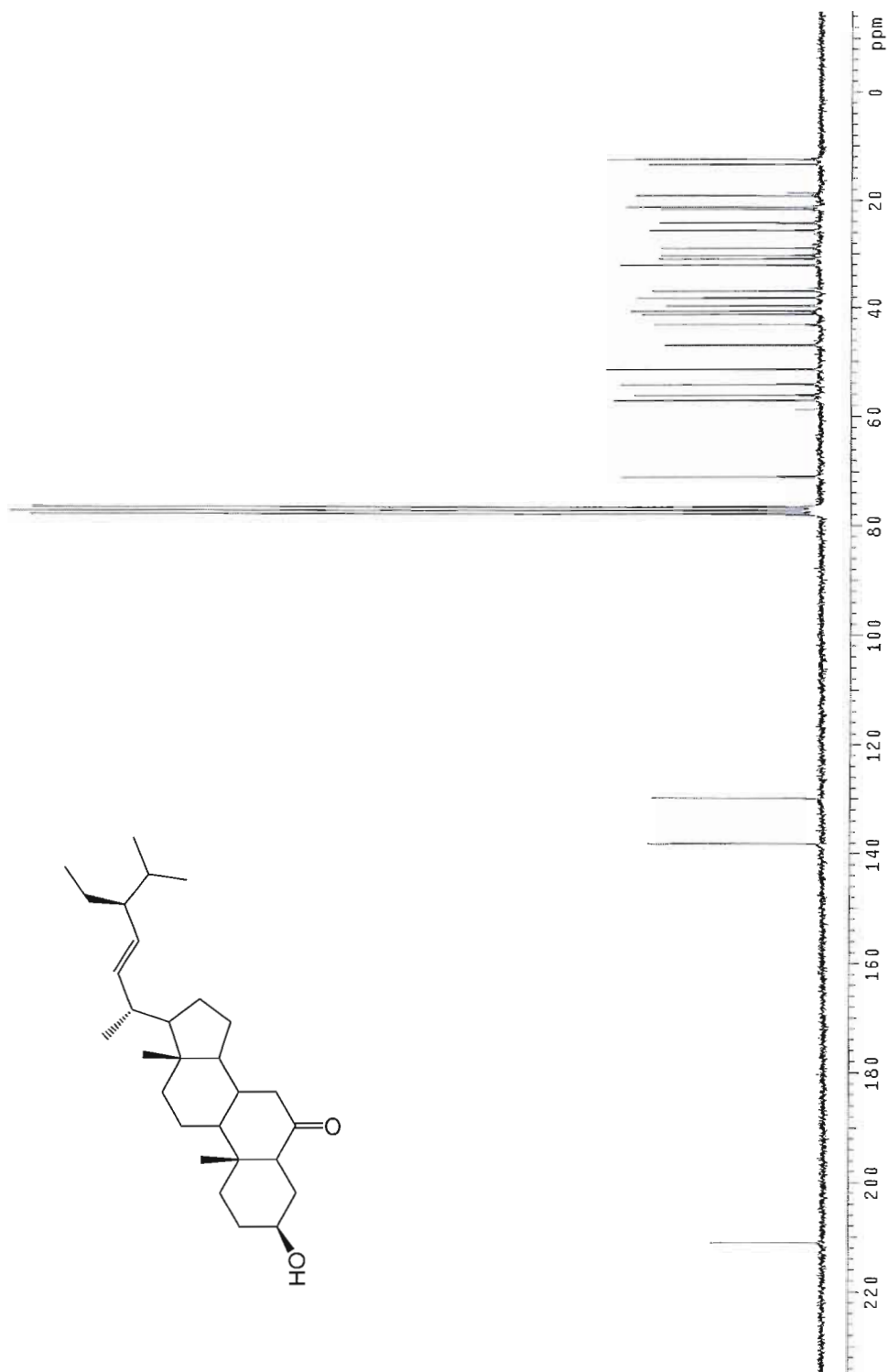
(22*E*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one 2,3-acetonide (**54**)



(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -acétoxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**55**)

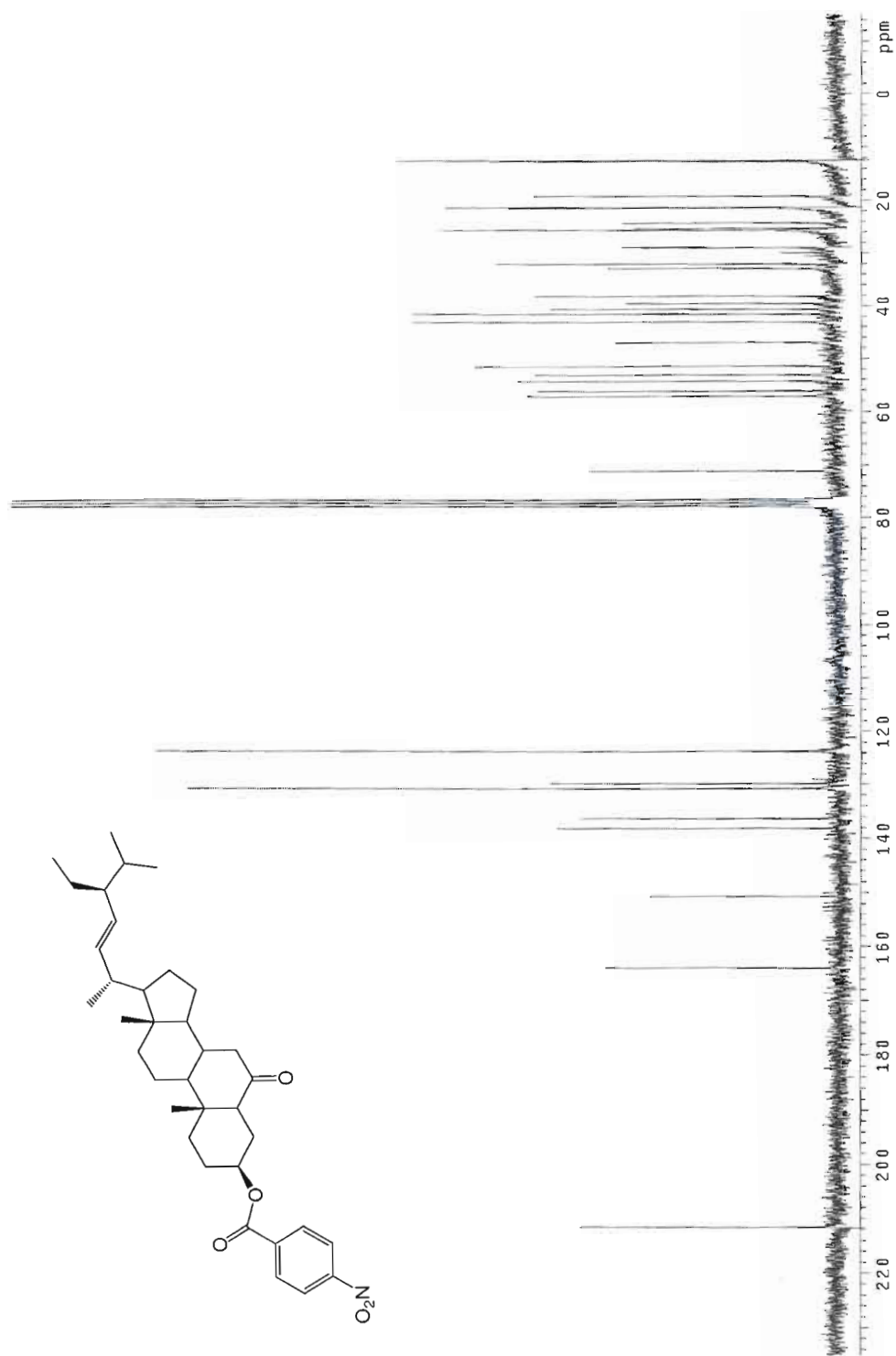


(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**33**)

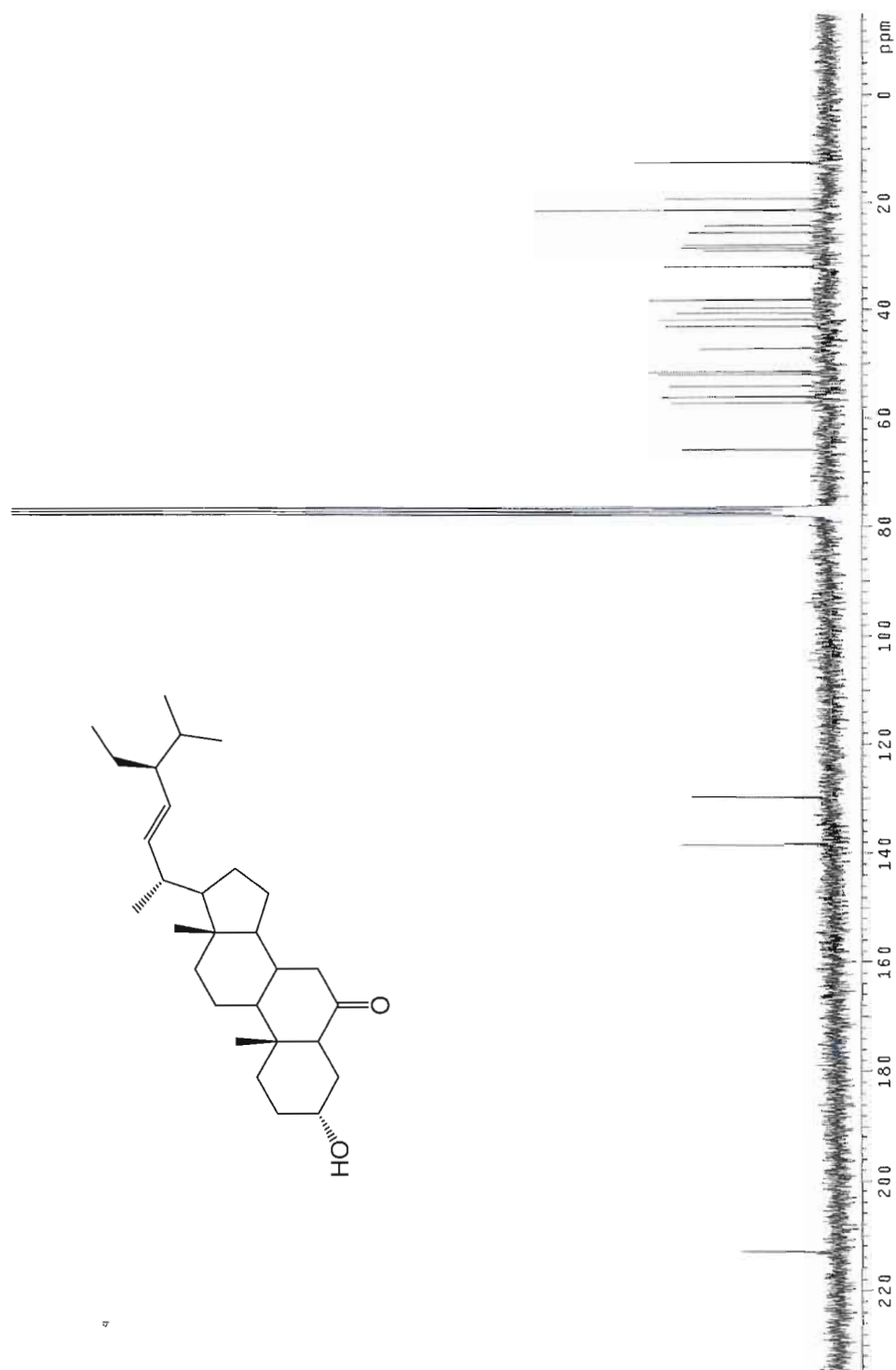




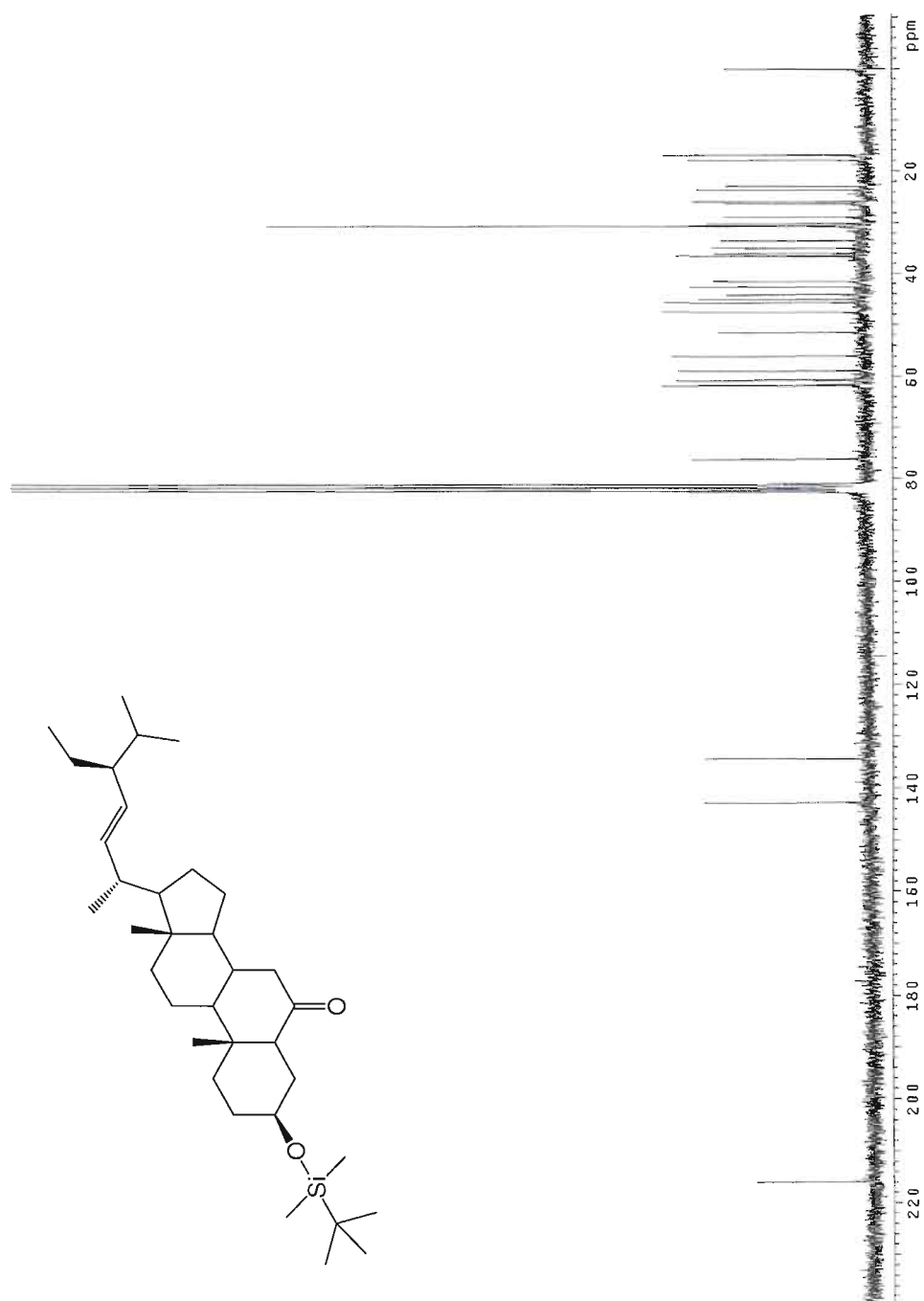
(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -(4-nitrobenzoyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**60**)



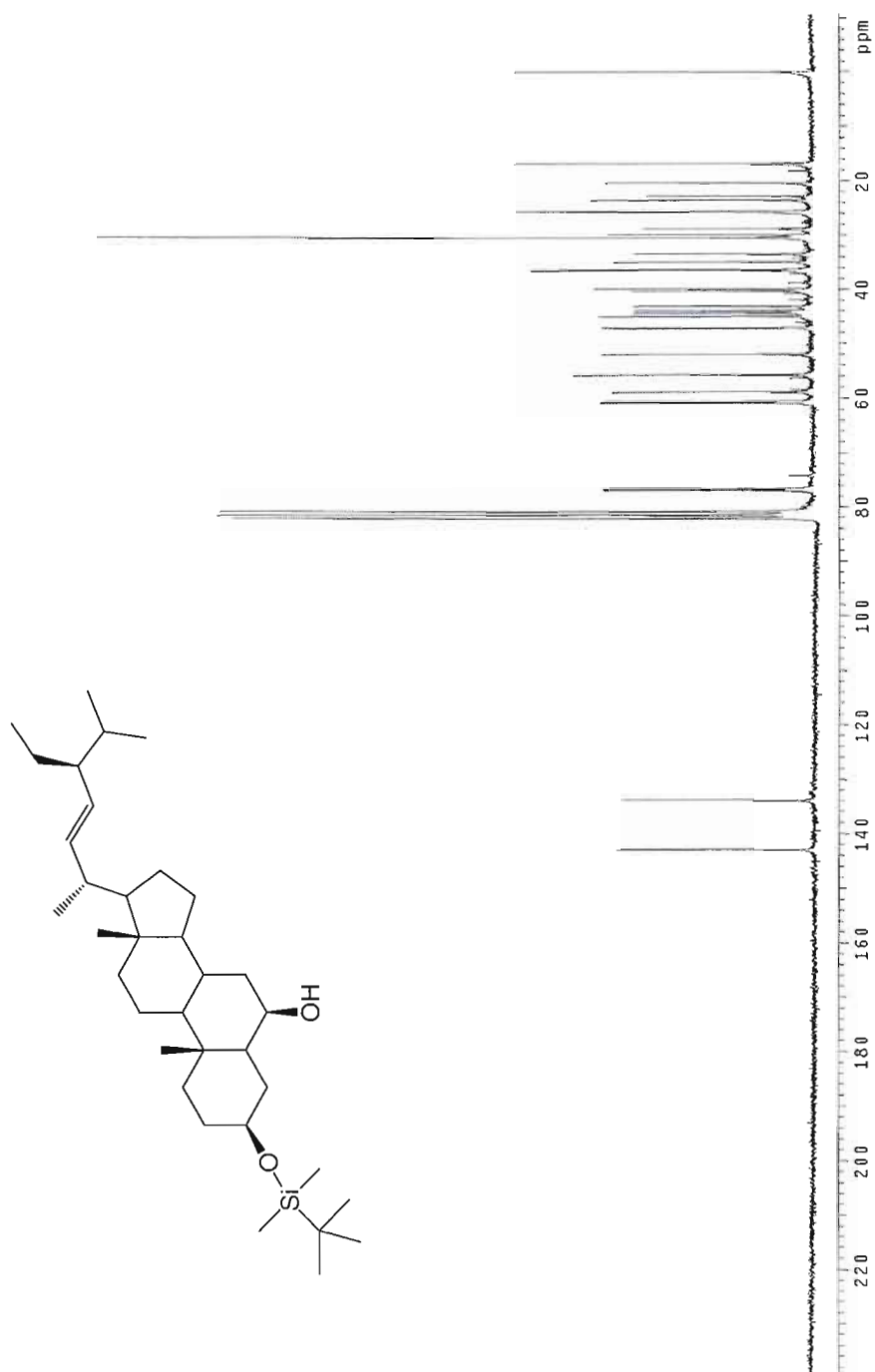
(22*E*, 24*S*)-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (**36**)



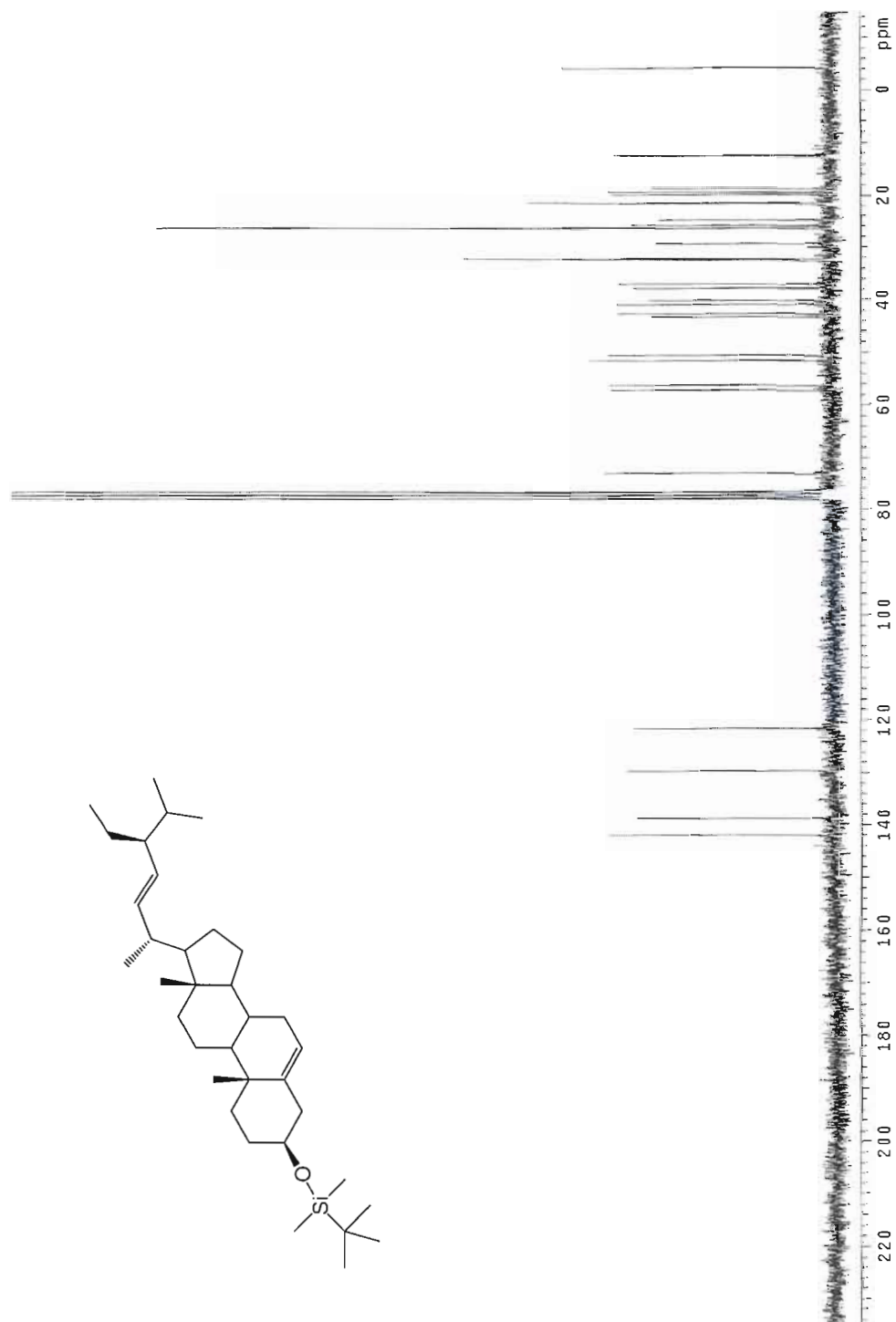
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one  
(**62**)



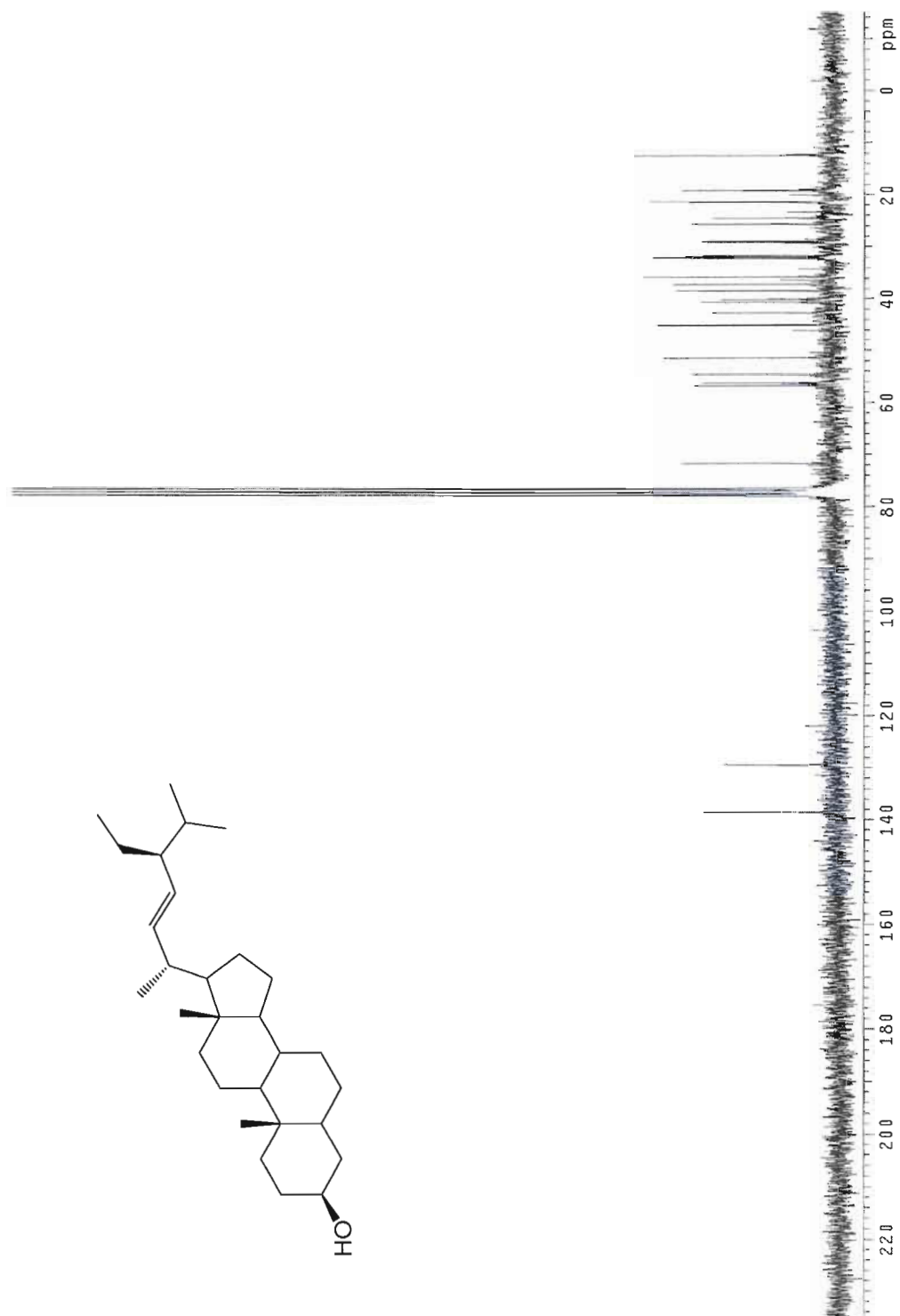
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-6 $\beta$ -ol  
(**63**)

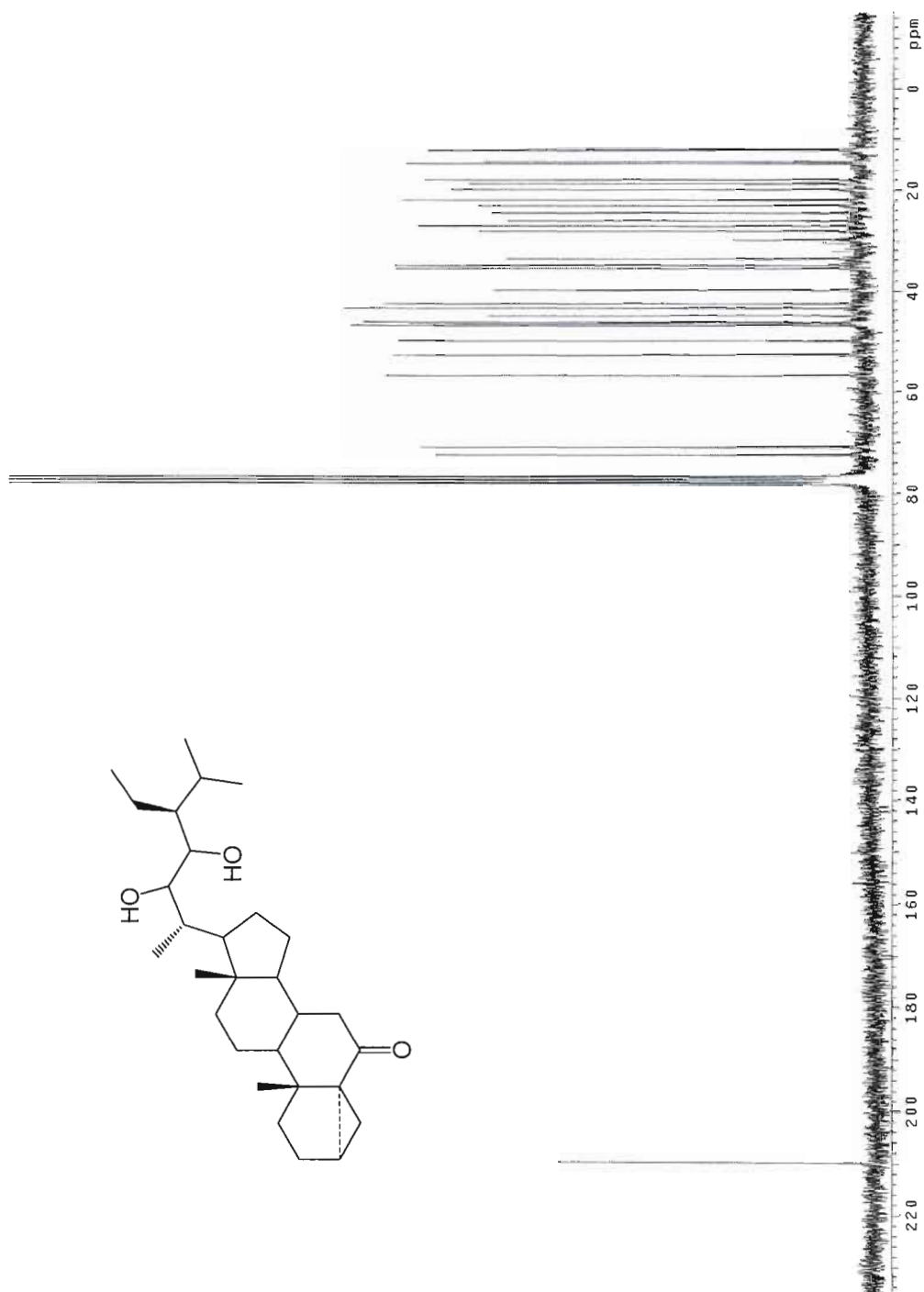


(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-stigmasta-5,22-diene (**65**)



(22*E*, 24*S*)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (**34**)



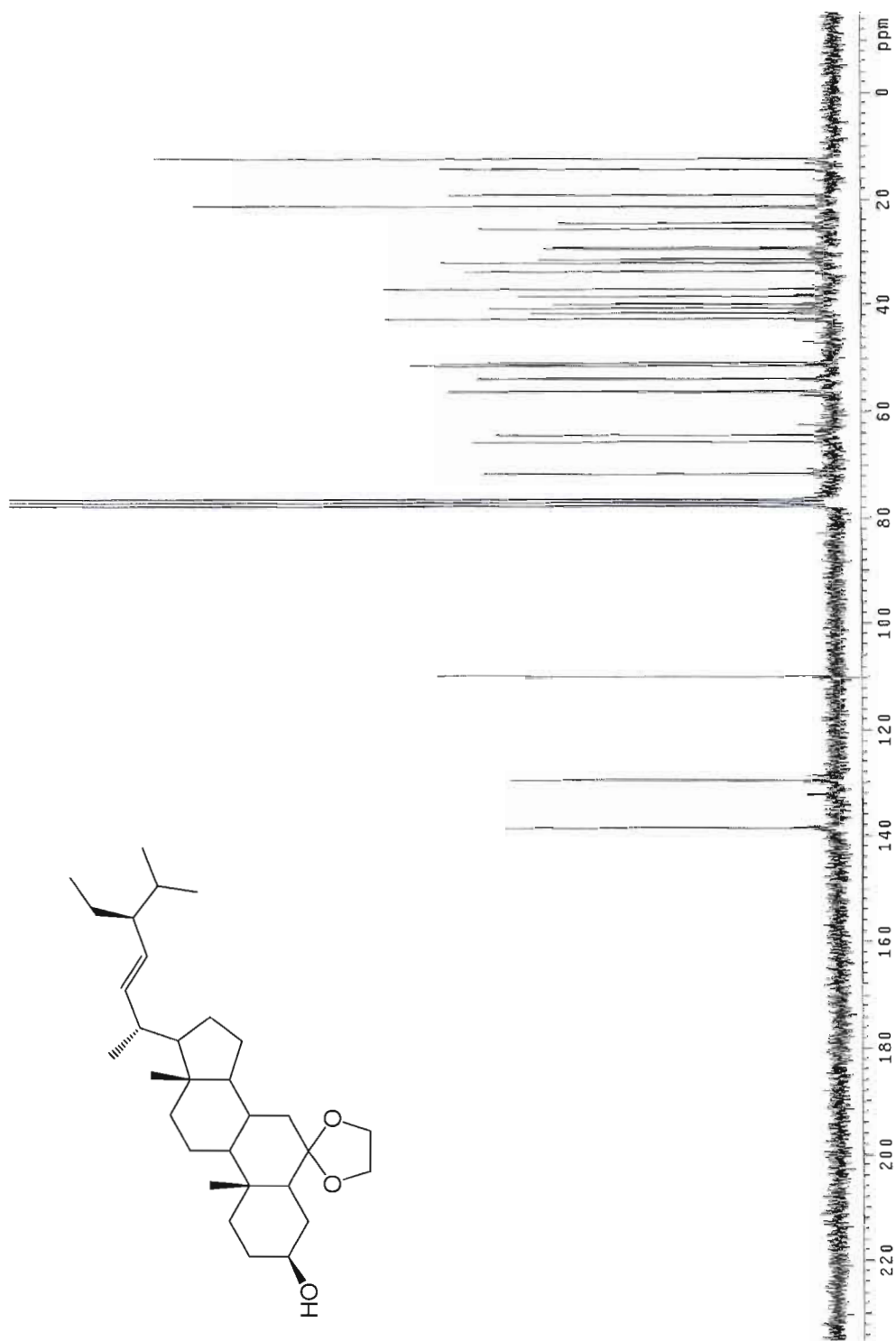


(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -acétoxy-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene (**77**)

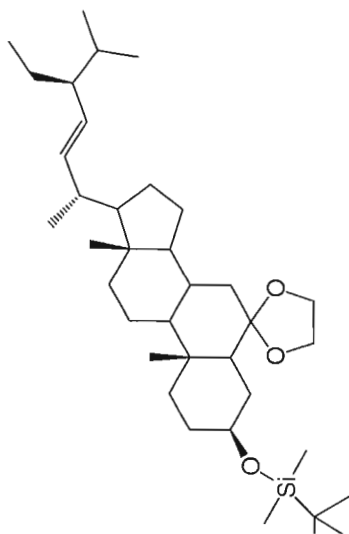
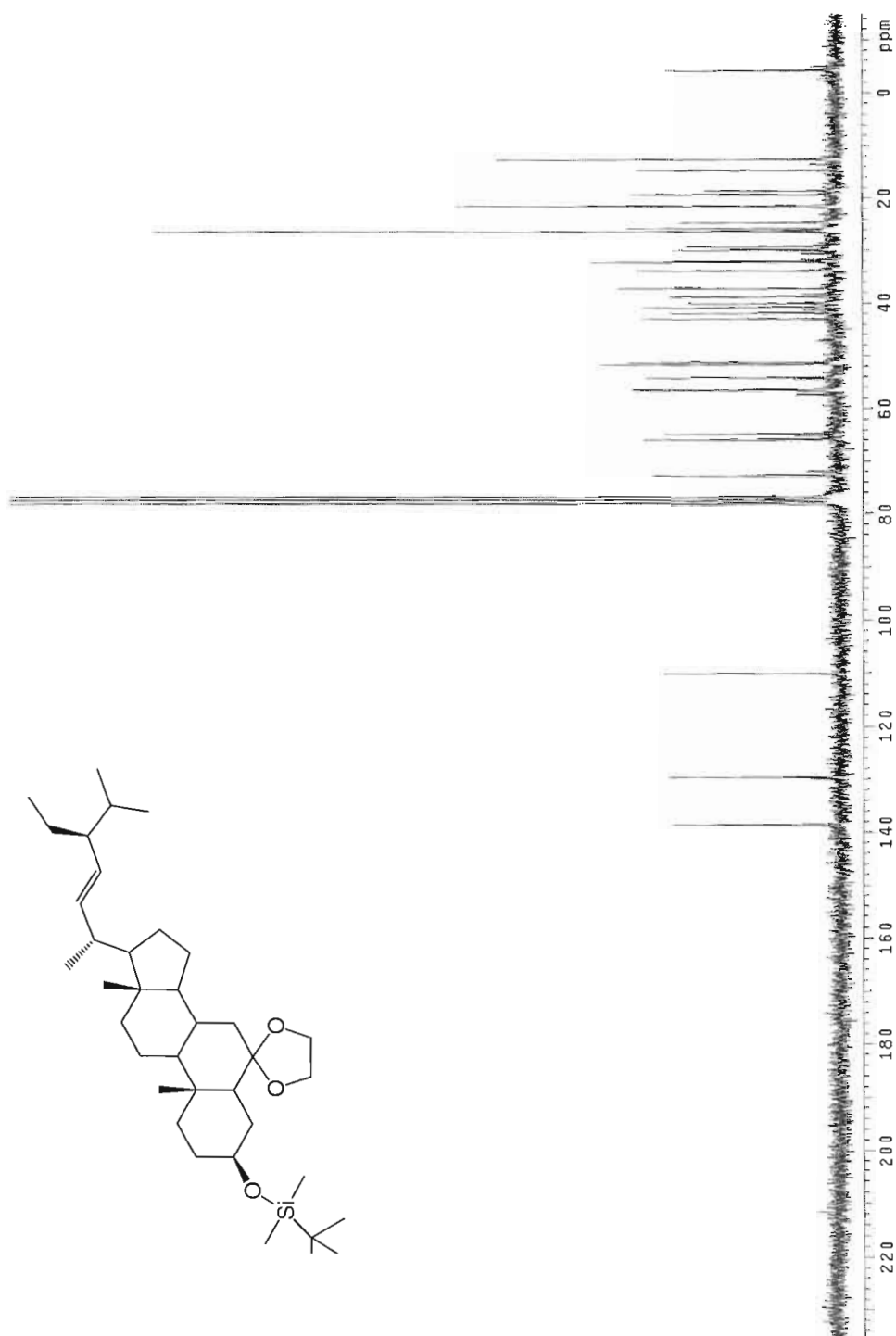




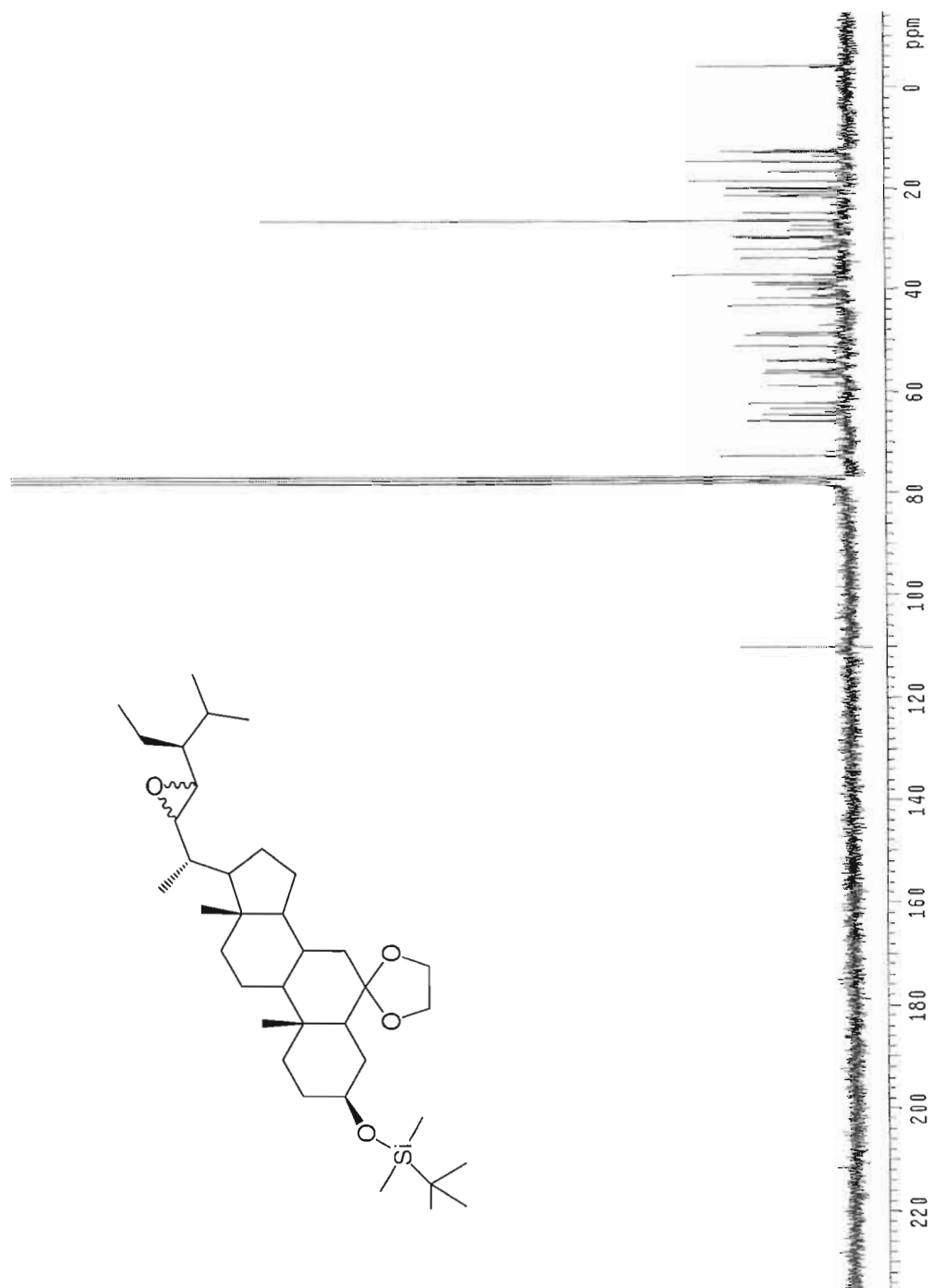
(22*E*, 24*S*)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-3 $\beta$ -ol (**78**)



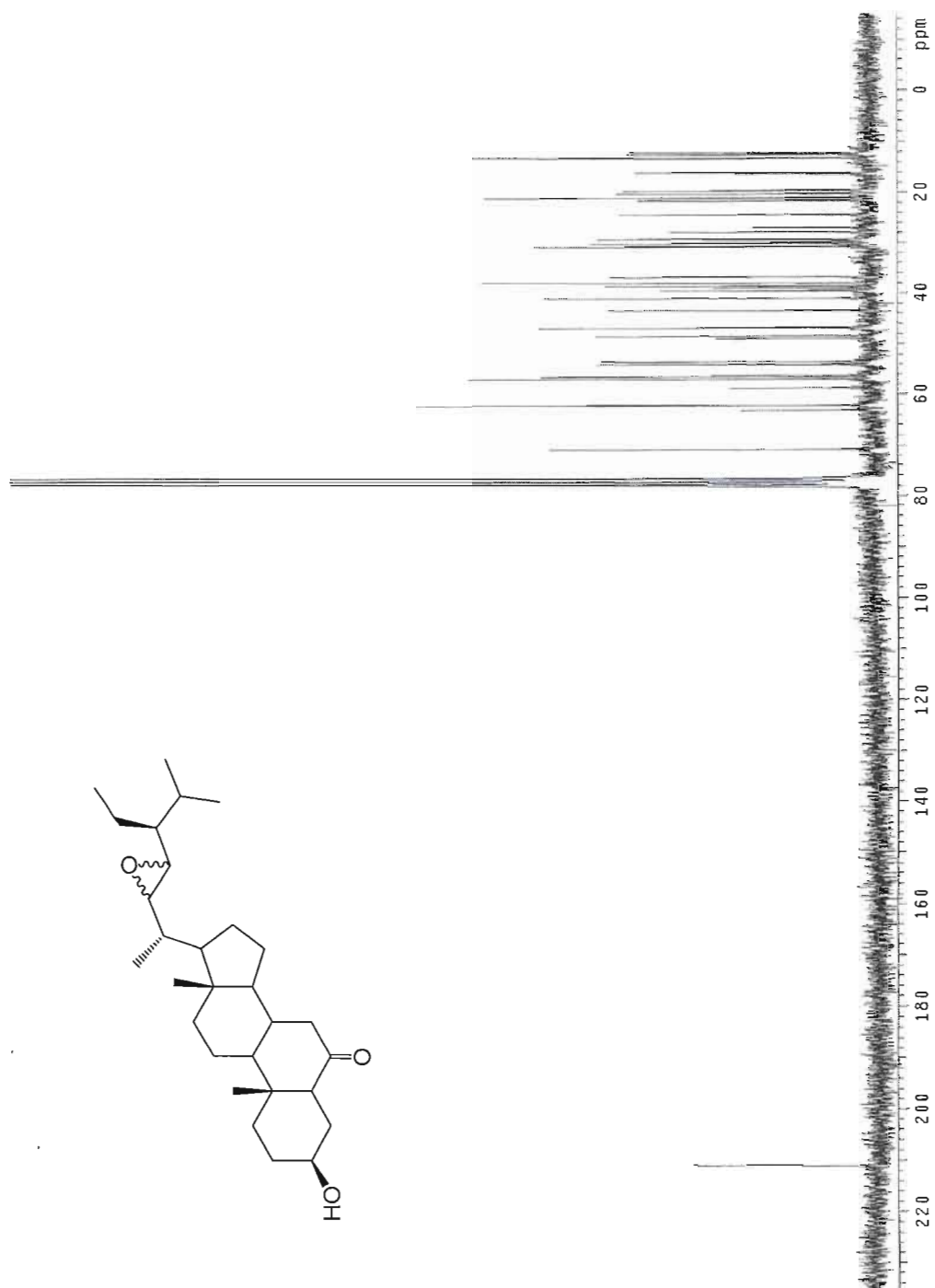
(22*E*, 24*S*)-3 $\beta$ -(1,1dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-5 $\alpha$ -stigmast-22-ene (**79**)



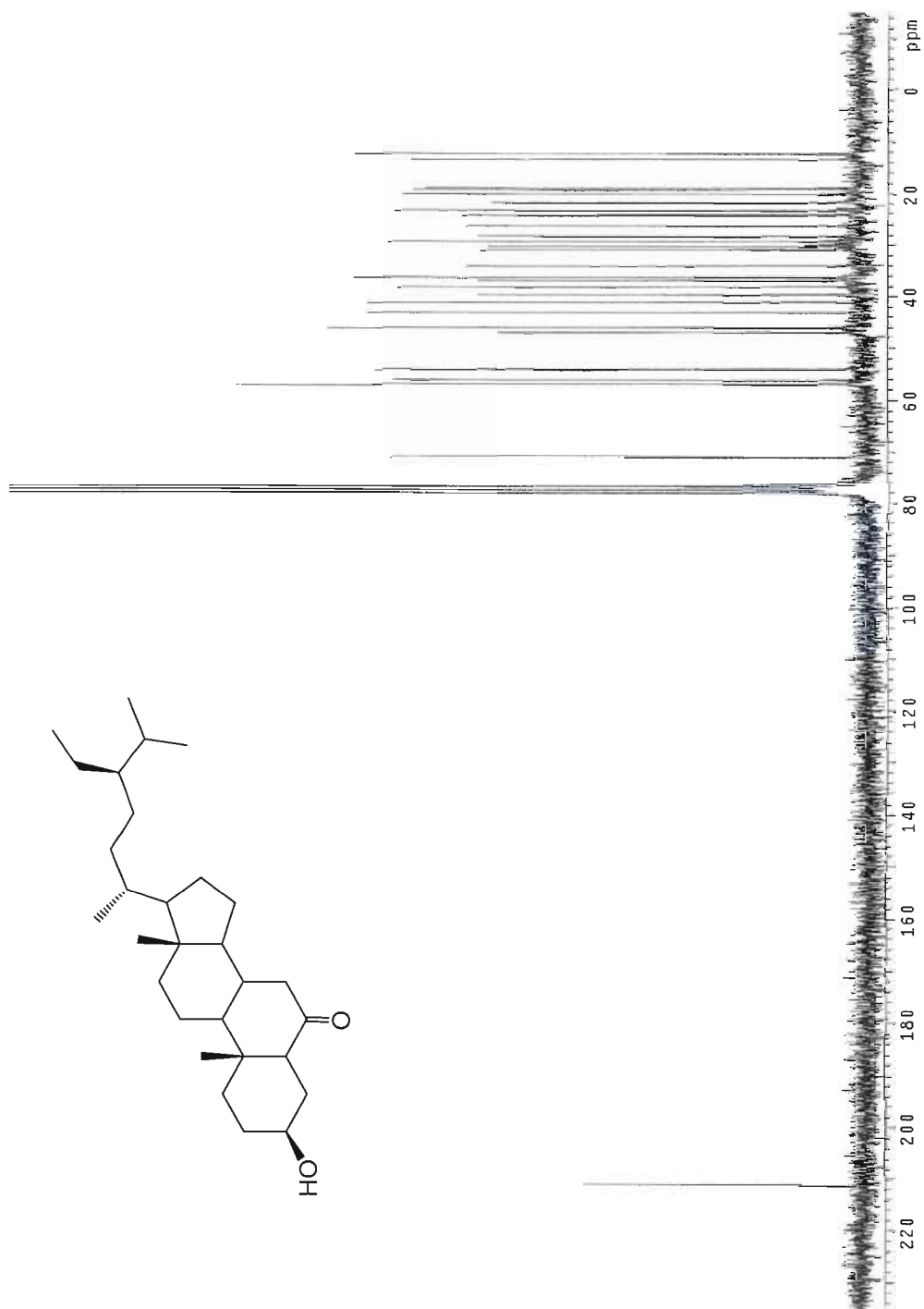
(24*S*)-3 $\beta$ -(1,1-dimethyl-(1,1-dimethylethyl)-silyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastane (**80**)



(24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-22,23-oxido-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**75**)



(24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**81**)



## RÉFÉRENCES

1. Mitchell, J.W. ; Mandava, N. ; Worley, J.F. ; Plimmer, J.R. ; Smith, M.V.; «Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen», *Nature* 1970, 225, p.1065-1066.
2. Pfeffer, P.E. ; Moore, G.G. ; Hoagland, P.D. ; Rothman, E.S. ; «Synthetic methods for carbohydrates», *ACS series* 39, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1977, p.155-178.
3. Mandava, N. ; Chandra, G.R. ; «Symposium on the pharmacological effect of lipids»; Chapitre 13, AOAC Monographie, No. 5, 1978, 133-144.
4. Grove, M.D. ; Spencer, G.F. ; Rohwedder, W.K. ; Mandava, N. ; Worley, J.F. ; Warthen, J.D. ; Steffens, G.L. ; Flippen-Anderson, J.L. ; Cook, J.C. , Jr ; «Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen», *Nature*, 1979, 281, p.216-217.
5. Steffens, G.L.; «U.S. department of agriculture brassins project », *Brassinosteroids : Chemistry, Bioactivity and Applications*, Chapitre 1, ACS symposium series 474, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1991, p.2-17.
6. Kim, S-K.; «Natural occurrences of brassinosteroids », *Brassinosteroids : Chemistry, Bioactivity and Applications*, Chapitre 3, ACS symposium series 474, Am. Chem. Soc. Washington, DC, 1991, p.26-35.
7. Bajguz, A.; «Metabolism of brassinosteroids in plants», *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45, p.95-107.

8. Yokota, T.; Ogino, Y.; Takahashi, N.; Saimoto, H.; Fujioka, S.; Sakurai, A.; «Brassinolide is biosynthesized from castasterone in *Catharanthus roseus* crown gall. ells», *Agric. Biol. Chem.* ,1990, 54(4), p.1107-1108.
9. Meudt. W.J., «Ecology and Metabolism of Plant Lipids», ACS symposium series 325, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1987, p.53-75.
10. Thompson, M.J. ; Mandava, N. ; Flippen-Anderson, J.L.; Worley, J.F. ; Dutky, S.R. ; Robbins, W.E. ; Lusby , W. ; «Synthesis of brassino steroids: new plant-growth-promoting steroids » *J. Org. Chem.* , 1979, 44(26), p.5002-5004.
11. Takematsu, T.; Takeuchi, Y.; «Effects of Brassinosteroids on Growth and Yields of Crops», *Proc. Japan. Acad. Ser. B*, 1989, 65(6), p.149-152.
12. Ikekawa, N.; Zhao, Y-J.; , «Application of 24-Epibrassinolide in Agriculture », *Brassinosteroids : Chemistry, Bioactivity and Applications*, Chapitre 24, ACS symposium series 474, Am. Chem. Soc. Washington, DC, 1991, p.280-291.
13. Bajguz, A.; Czerpak, R. ; «Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae)», *J. Plant Growth Regul.*, 1998, 17, p.131-139.
14. Braun, P.; Wild, A. ; «The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants», *J. Plant Physiol.*, 1984, 116, p. 189-196.
15. H. Ehsan.; Ray, W.K.; Phinney, B.; Wang, X.; Huber, S.C.; Clouse, S.D; «Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF- $\beta$  receptor interacting protein», *Plant J.*, 2005, 43(2), p.251-261.
16. Site web de la Société Parkinson Québec <http://www.parkinsonquebec.ca/fr/fr-home.htm>
17. Dauer, W.; Przedborski, S. ; «Parkinson's Disease : Mechanisms and Models», *Neuron*, 2003, 39, p.889-909.

18. Bové, J.; Prou, D. ; Perier, C.; Przedborski, S. ; «Toxin-Induced Models of Parkinson's Diseases», *NeuroRx*, 2005, 2(3), p.484-494.
19. Sayre, L.; Perry. G.; Smith, M.A.; «Oxidative Stress and Neurotoxicity», *Chem.Res.Toxicol.* , 21(1), 2008, p.172-188
20. Sayre, L.; Smith, M.A.; Perry. G.; «Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease», *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8(7), p.721-738.
21. Zhang, J.; Perry, G.; Smith, M.A.; Robertson, D.; Olson,S.J.; Graham, D.G.; Montine, T.; «Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons», *J. Am. J .Pathol.*, 1999, 154, p.1423-1429.
22. Alam, Z. I., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Jenner, P. and Halliwell, B. «A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease», *J. Neurochem.*, 1997, 69, p.1326–1329.
23. Cohen, G.; «Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease», *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2000, 899, p.112–120.
24. Graham, D.G.; «Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones», *Mol. Pharmacol.* 1978, 14, p.633–643.
25. Garcia-Segura, L.M., Azcoitia I.; DonCarlos, L.L.; «Neuroprotection by estradiol», *Progress. Neurobiol.*, 2001, 63(1), p.29-60.
26. Behl, C.; «Oestrogen as a neuroprotective hormone», *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002, 3(6), p.433-442.
27. Nunez, M.; Mazzafera, P.; Mazorra, L.M.; Siqueira, W.J.; Zullo, M.A.T; «Influence of brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl», *Biologia Plantarum*, 2003, 47(1), p.67-70.
28. Khripach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; de Groot, A.E.; «Brassinosteroids: a new class of hormones», Chapitre 2 et 3, Éditions Academic press, 1999, p-7-25.



29. Bajguz, A.; Tretyn, A.; «The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants», *Phytochem.*, 2003, 62, p.1027-1046.
30. Dinan, L.; Harmatha, J.; Lafont, R.; «Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids», *J. Chromatography A.*, 2001, 935, p.105-123.
31. McMorris, T.C.; Patil, A.P.; Chavez, R.G.; Baker, M.E.; Clouse, S.D.; «Synthesis and Biological Activity of 28-Homobrassinolide and Analogues», *Phytochem.*, 1994, 36(3), p.585-589.
32. McMorris, T.C.; Chavez, R.G.; Patil, A.P.; «Improved synthesis of brassinolide», *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.*, 1996, p.295-301.
33. Brosa, C.; «Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids», *Steroids*, 59(8), p.463-467.
34. Mori, K.; Sakakibara, M.; Ichikawa, Y.; Ueda, H.; Okada, K. Umemura, T.; Yabuta, G.; Kuwahara, S.; Kondo, M.; Minobe, M.; Sogabe, A.; *Tetrahedron*, 1982, 38(14), p.2099-2109.
35. Winstein, S.; Adams, R.; «Role of neighboring groups in replacement reactions. XIV. The 5,6-double bond in cholesteryl p-toluenesulfonate as a neighboring group», *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, p.838-840
36. Miller, B.; «Advanced Organic Chemistry», Chapitre 7, seconde édition, Pearson Education Edition, New Jersey, 2003.
37. Mitsunobu, O.; Yamada, M.; Mukaiyama, T.; «Preparation of esters of phosphoric acid by the reaction of trivalent phosphorus compounds with diethyl azodicarboxylate in the presence of alcohols», *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1967, 40, p.2380-2382.
38. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.; «Organic Chemistry», 1<sup>st</sup> Edition, Oxford University Press, 2000, p.995-996.

39. Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; «Remote substituent effect on the regioselectivity in the Baeyer-Villiger oxidation of  $5\alpha$ -cholestan-6-one derivative», *Tetrahedron Lett.*, 1983, 24(9), p.917-920.
40. Back, T.G.; Blazecka, P.G.; Krishna, M.V.; « A new synthesis of castasterone and brassinolide from stigmaterol. A concise and stereoselective elaboration of the side chain from a C-22 aldehyde», *Can .J. Chem.*, 1993, 56, p.156-163.
41. Sharpless, K.B.; Amberg, W.; Bennani, Y.L.; Crispino, G.A.; Hartung, J.; Jeong, K-S.; Kwong, H-L.; Morikawa, K.; Wang, Z-M.; Xu, D.; Zhang, X-L.; «Osmium Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation : A New Ligand Class and a Process», *J. Org. Chem.*, 1992, 57, p.2768-2771.
42. Jacobsen, E.N.; Marko, I.; Mungall, W.S.; Schroder, G.; Sharpless, K.B.; « Asymmetric Dihydroxylation via Ligand-Accelerated Catalysis», *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, p.1968-1970.
43. Noe, M.C.; Letavec, M.A.; Snow, S.L.; «Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes», *Organic Reactions*, 2005, 66, p106-213.
44. Watanabe, T.; Noguchi, T.; Yokota, T.; Shibata, K.; Koshino, H.; Seto, H.; Kim, S-K.; Takatsuto, S.; «Synthesis and biological activity of 26-norbrassinolide, 26-norcastasterone and 26-nor-6-deoxocastasterone», *Phytochem.*, 2001, 58, p.343-349.
45. Steele, J.A.; Mosettig, E.; «The Solvolysis of Stigmasteryl Tosylate», *J. Org. Chem.*, 1963, 28, p.571-572.
46. Karplus, M.; «Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance» *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85(18), p.2870-2871.
47. Bowden, K.; Heilbron, I.M.; Jones, E.R.H.; «Researches on acetylenic compounds. Part I. The preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols», *J. Chem. Soc.*, 1946, 13, p.39-45.
48. Vollhardt, K.P.; Schore, N.E.; «Traité de Chimie Organique», Chapitre 8, Traduction de la 4<sup>e</sup> édition Américaine, Éditions Deboeck Université, Bruxelles, 2004, p.276-307.

49. Vollhardt, K.P.; Schore, N.E.; «Traité de Chimie Organique», Chapitre 7 et 20, Traduction de la 4<sup>e</sup> édition Américaine, Éditions Deboeck Université, Bruxelles, 2004, p.243-265 et p.864-922.
50. VanRheenen, V.; Kelly, R.C.; Cha, D.Y.; « An improved catalytic OsO<sub>4</sub> oxidation of olefins to *cis* -1,2-glycols using tertiary amine oxides as the oxidant », 1976, *Tetrahedron Lett.*, 17(23), p.1973-1976.
51. Aburatani, M.; Takeuchi, T.; Mori, K.; « Facile Syntheses of Brassinosteroids : Brassinolide, Castasterone, Teasterone and Typhasterol», *Agric. Bio. Chem*, 1987, 51(7), p.1909-1913.
52. Bernhard, H.; Brunhilde, V.; Jurgen, S.; Gunter, A.; «Synthesis of new oxygenated and unsaturated brassinosteroids analogs», *Steroids*, 1997, 62(5), p.415-421.
53. Huang, L-F.; Zhou, W-S.; Pan, X.; « Steroidal plant-growth regulators. Part 29. Osmium tetroxidecatalyzed asymmetric dihydroxylation of the (22E,24R)- and the (22E,24S)-24-alkyl steroidal unsaturated side chain», *J. Chem. Soc, Perkin Trans. I*, 1993, 14, p.1683-1686.
54. Anh, N. T., «Regio- and stereo-selectivities in some nucleophilic reactions» *Top. Curr. Chem.* 1980, 88, p.146-161.
55. Fujioka, S.; Inoue, T.; Takatsuto, S.; Yanagisawa, T.; Yokota, T.; Sakurai, A.; «Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone», *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, 59(8), p.1543-1547.
56. Skoog, D.; West, D.M.; Holler, F.J.; «Chimie Analytique», Appendice 3, traduction de la 7<sup>e</sup> édition américaine, Éditions Deboeck Université, Bruxelles, 2002.
57. Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J.; «Spectrometric Identification of Organic Compounds», Chapitre 3, Seventh Edition, John Wiley and Sons, New York, 2005.

58. Martin, S.; Dodge, J.A.; «Efficacious modification of the Mitsunobu reaction for inversions of sterically hindered secondary alcohols», *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32(26), p.3017-3020.
59. Organic Chemistry Web Portal : The Mitsunobu reaction, <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/mitsunobu-reaction.shtm>
60. Myers, A.G.; Zheng, B.; «An efficient method for the reductive transposition of allylic alcohols», *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37(28), p.4841-4844.
61. Corey, E.J.; Venkateswarlu, A.; « Protection of hydroxyl groups as *t*-butyldimethylsilyl derivatives », *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94(17), p.6190-6191.
62. Luche, J-L.; « Lanthanides in organic chemistry. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones », *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100(7), p-2226-2227.
63. Vollhardt, K.P.; Schore, N.E.; «Traité de Chimie Organique», Chapitre 11, Traduction de la 4<sup>e</sup> édition Américaine, Éditions Deboeck Université, Bruxelles, 2004, p.431-460.
64. Caglioti, L.; Moser, J.F.; Eschenmoser, A.; «Reduction of ketones by use of the tosylhydrazone derivatives: Androstan-17- $\beta$ -ol», *Organic Syntheses. Coll.*, 1988, 6(62), p.62-65.
65. Miller, B.; «Advanced Organic Chemistry», Chapitre 4, seconde édition, Pearson Education Edition, New Jersey, 2003.
66. Ramirez, J.A.; Gros, E.G.; Galagovsky, L.R.; «Effects on Bioactivity due to C-5 Heteroatom Substituent on Synthetic 28-Homobrassinolid Analogs», *Tetrahedron*, 2000, 56, p.6171-6180.
67. Khripach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; Ivanova, V.G.; «Sharpless Assymetric Hydroxylation of  $\Delta^{22}$ -steroids of the stigmastane series», *Seryya Khimichnykh Navuk*, 1, p.46-51.

68. Shing, T.K.; Tam, E.K.W.; Tai, V.W-F.; Chung, I.H.F.; Jiang, Q.; «Ruthenium-Catalyzed *cis*-Dihydroxylation of Alkenes : Scope and Limitations», *Chem. Eur. J.*, 1996, 2(1), p.50-57.
69. a) Hazra, G.; Pore, V.S.; Massey, P.A.; « New Route for the Synthesis of (22*S*,23*S*)-28-Homobrassinolide», *Synthesis*, 2003, 3, p.426-430. b) Woodward, R. B.; Brutcher, F. V., Jr.; «*Cis* hydroxylation of a synthetic steroid intermediate with iodine, silver acetate, and wet acetic acid», *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, p.209-211.
70. Misharin, A.Y.; Mehtiev, A.R.; Morozevich, G.E; Tkachev, Y.V.; Timofeev, V.P.; «Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives», *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, p.1460-1473.
71. Cadot, C.; Poirier, D.; Philip, A.; «First synthesis of a steroid containing an unstable 19-nor-androsta-1,5-dien-3-one system», *Tetrahedron*, 2006, 62, p.4384-4392.
72. Qu, J.; Xu, Z-B.; Cui, Y-T.; Wang, Z.; «Hot Water-Promoted Ring-Opening of Epoxides and Aziridines by Water and Other Nucleophiles», *J. Org. Chem.*, 2008, 73, p.2270-2274.
73. Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J.; «A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of substantia nigra by N-methyl-4-phenyl,1,2,3,6-tetrahydropyridine», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1983, 80, 4546-4550.
74. Greene, L.A.; Tischler, A.S.; «Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1976, 7(73), p.2424-2428.